

Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso, para el control de *Clostridium* spp. responsables del defecto de “hinchazón tardía”

Lic. Bq. Jorge Olivera Rodi

Tutor: Dra. Stella Reginensi
Co-tutor: Dr. Pedro Díaz Gadea

Unidad de Tecnología de los Alimentos
Facultad de Agronomía

Agradecimientos

A mi Tutora de Tesis de Maestría Stella Reginensi, por darme la oportunidad de realizar mi Tesis de Grado y Posgrado en la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía, ser fuente de inspiración en mi formación académica y profesional, así como por el conocimiento brindado. Asimismo, quiero destacar la figura de Jorge Bermúdez, quien me brindó la posibilidad de realizar mi Tesis de Maestría en la temática planteada, guio mi formación académica y fue un pilar fundamental de la Unidad de Tecnología de los Alimentos.

Agradezco a mi Co-tutor de Tesis Pedro Díaz Gadea de la Cátedra de Bioquímica del Departamento de Biología Vegetal de Facultad de Agronomía por su guía y asesoramiento en los procesos de extracción y purificación de los compuestos anticlostridiales.

Quiero agradecer a CSIC haber financiado esta investigación por medio del Programa CSIC Iniciación a la Investigación y a la Comisión de Posgrado de Biotecnología por las Alícuotas de Apoyo Económico asignadas.

Mi agradecimiento a Madelón Portela de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UBYPa) del Instituto Pasteur de Montevideo, quien realizó los análisis de espectrometría de masas.

Por otra parte, deseo mencionar a María Julia Pianzzola, Gabriela Irazoqui y Silvana Alborés de la Facultad de Química por aceptar integrar el Tribunal evaluador de esta Tesis, así como por los consejos y devoluciones recibidos.

Al resto de mis compañeros de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Marcela González, Jimena Viejo, Nancy Scaronne y Carlos Mattos quienes al igual que Stella Reginensi, me han apoyado a lo largo de todos estos años y con los cuales he compartido tantos momentos.

A mis padres Julia Rodi y Héctor Olivera, en reconocimiento a su apoyo, guía, comprensión y estímulo para que siguiera avanzando en mi formación académica. También agradezco a amigos y compañeros de Facultad de Ciencias y Facultad de Agronomía por los momentos compartidos y el ánimo brindado.

Índice

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	10
Resumen	11
Abreviaciones	12
1. Introducción	13
1.1 Quesos: definición y proceso de elaboración	13
1.2 Clasificación de quesos	19
1.3 Defectos en quesos	20
1.4 Defecto de hinchazón tardía	23
1.4.1 Generalidades	23
1.4.2 Factores que afectan el desarrollo de hinchazón tardía	26
1.5 Características del género <i>Clostridium</i>	29
1.6 Esporulación y germinación en <i>Clostridium</i> spp.	31
1.7 Métodos de control del desarrollo de <i>Clostridium</i> spp.	34
1.8 Fuentes de contaminación y estrategias de control a nivel del tambo	38
1.9 Bacterias ácido lácticas	42
1.9.1 Cultivos iniciadores	44
1.9.2 Clasificación de cultivos iniciadores	45
1.9.3 Desarrollo y contribución de las NSLAB en quesos	48
1.9.4 Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas	50
1.9.4.1 Ácidos orgánicos	51
1.9.4.2 Peróxido de hidrógeno	53
1.9.4.3 Acetaldehído, diacetilo y acetoína	53
1.9.4.4 Reuterina	54
1.9.4.5 Reutericiclina	56

1.9.4.6 D-aminoácidos	56
1.9.4.7 Bacteriocinas	57
1.9.4.7.1 Mecanismos de acción	57
1.9.4.7.2 Clasificación de las bacteriocinas	58
1.9.4.7.4 Estrategias para incorporar las bacteriocinas en los alimentos	62
1.9.5 Bacterias ácido lácticas con acción anticlostridial	63
2. Objetivo general	67
2.1 Objetivos específicos	67
3. Materiales y métodos	68
3.1 Obtención y procesamiento de muestras	68
3.2 Determinación del NMP de esporas	68
3.3 Aislamiento de cepas LAB y NSLAB	68
3.4 Selección de cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial	68
3.4.1 Técnica de confrontación por estrías	69
3.4.2 Método de difusión en placa	69
3.4.3 Método de la doble capa de agar	69
3.5 Identificación y caracterización genotípica de las cepas con actividad anticlostridial	70
3.5.1 Extracción de ADN genómico	70
3.5.2 Secuenciación del gen del ARNr 16S	70
3.5.3 Caracterización mediante técnicas de fingerprinting	71
3.5.3.1 Caracterización genotípica mediante RAPD-S1 y RAPD-S4	71
3.5.3.2 Caracterización genotípica por (GTG) ₅ -PCR	71
3.5.3.3 Caracterización genotípica por BOX-PCR	71
3.5.3.4 Análisis de los perfiles de fingerprinting	72
3.5.4 Identificación por técnicas de PCR especie-específicas	72
3.6 Determinación de los mecanismos de acción inhibitoria	73

3.7 Evaluación de la acción inhibitoria de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB sobre aislamientos de <i>Clostridium</i> nativos de productos lácteos	73
3.8 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos	74
3.9 Purificación y caracterización de compuestos anticlostridiales	74
3.10 Evaluación de la sensibilidad de <i>C. tyrobutyricum</i> a la nisina	75
3.11 Determinación de la sensibilidad de cepas LAB y NSLAB a la lisozima	76
3.12 Evaluación de la actividad anticlostridial de la lisozima	76
3.13 Comparación de la acción anticlostridial de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB respecto a la lisozima y en combinación con ésta	77
4. Resultados y discusión	78
4.1 Determinación del NMP de esporas	78
4.2 Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial	78
4.3 Identificación y diversidad genética de las cepas con actividad anticlostridial	84
4.4 Determinación de los mecanismos de acción inhibitoria	90
4.5 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos	96
4.6 Evaluación de la acción inhibitoria de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB sobre aislamientos de <i>Clostridium</i> nativos de productos lácteos	103
4.7 Purificación y caracterización de compuestos anticlostridiales	110
4.8 Evaluación de la sensibilidad de <i>C. tyrobutyricum</i> a la nisina	120
4.9 Evaluación de la actividad anticlostridial de las fracciones eluídas	120
4.10 Determinación de la sensibilidad de cepas LAB y NSLAB a la lisozima	122
4.11 Evaluación de la acción anticlostridial de la lisozima	124
4.12 Comparación de la acción anticlostridial de cepas LAB y NSLAB respecto a la lisozima y en combinación con ésta	125
5. Conclusión y perspectivas futuras	128
6. Anexos	130
Anexo 1	130
Anexo 2.1	134

Anexo 2.2	150
Anexo 3	154
Anexo 4	158
7. Bibliografía	160

Índice de Figuras

Figura 1. Reagrupación de las micelas de caseínas de la leche por coagulación mixta.	14
Figura 2. Etapas de la producción quesera en la elaboración de quesos madurados.	18
Figura 3. Fotos de quesos afectados por hinchazón tardía.	24
Figura 4. Fermentación ácido butírica.	31
Figura 5. Esquema de la estructura de la espora y micrografías electrónicas de transmisión de esporas de <i>C. tyrobutyricum</i> .	32
Figura 6. Etapas del proceso de esporulación bacteriana.	33
Figura 7. Proceso de germinación de esporas bacterianas.	34
Figura 8. Vías de contaminación de la leche cruda con esporas de <i>Clostridium</i> spp.	38
Figura 9. Balances químicos de las fermentaciones homoláctica y heteroláctica.	43
Figura 10. Recuento bacteriano (UFC/g) a lo largo del tiempo (días) de las poblaciones LAB y NSLAB en queso.	49
Figura 11. Compuestos antibacterianos generados a partir de la reuterina.	55
Figura 12. Clasificación de bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram-positivas.	59
Figura 13. Mecanismo de acción asociado a cada clase de bacteriocina.	61
Figura 14. Método de confrontación de estrías en agar MRS.	79
Figura 15. Método de difusión en discos en placas de agar RCM.	80
Figura 16. Gráfica del diámetro de halo de inhibición obtenido para cada cepa por el método de difusión en agar.	81
Figura 17. Método de la doble capa de agar.	82
Figura 18. Recuentos bacterianos (UFC/mL) de <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755 obtenidos en las placas correspondientes al método de la doble capa.	83
Figura 19. Predominio de cada especie respecto al total de aislamientos BAL con actividad anticlostridial.	84

Figura 20. Porcentaje de cepas LAB y NSLAB con actividad anticlostridial en leche, queso y suero lácteo.	86
Figura 21. Dendrogramas construídos a partir de los perfiles de bandas de las técnicas de Rep-PCR: BOX-PCR y (GTG) ₅ -PCR.	87
Figura 22. Dendrogramas construídos a partir de los perfiles de bandas de las técnicas de RAPD-S1 y RAPD-S4.	88
Figura 23. Cepas de BAL con acción anticlostridial causada solamente por acidez.	90
Figura 24. Determinación del mecanismo de inhibición de BAL C.	92
Figura 25. Placas correspondientes a la determinación de los mecanismos de inhibición de las cepas <i>L. casei</i> 26 y <i>L. casei</i> 95.	94
Figura 26. Determinación del mecanismo de inhibición de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	95
Figura 27. Cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> 26.	97
Figura 28. Cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> 95.	98
Figura 29. Cinética de crecimiento de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	102
Figura 30. Inhibición producida por los sobrenadantes de las cepas 26, 76, 95 y BAL C.	103
Figura 31. Gráficas del diámetro de los halos (cm) producidos en cepas de <i>Clostridium</i> spp. en presencia de los sobrenadantes pertenecientes a los aislamientos 26 y 95.	105
Figura 32. Gráficas del diámetro de los halos (cm) producidos en cepas de <i>Clostridium</i> spp. en presencia de los sobrenadantes pertenecientes al aislamiento 76 y la cepa BAL C.	106
Figura 33. Gráficas comparativas del diámetro de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76 en cepas de <i>C. tyrobutyricum</i> y <i>C. sporogenes</i> .	107
Figura 34. Gráficas comparativas del diámetro de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76 en cepas de <i>C. butyricum</i> y <i>C. beijerinckii</i> .	108
Figura 35. Verificación de la acción inhibitoria del precipitado obtenido para BAL C.	110
Figura 36. Actividad anticlostridial de la fracción separada por HPLC a partir del extracto crudo de BAL C.	111
Figura 37. Evaluación de la acción anticlostridial de las fracciones obtenidas por HPLC a partir del extracto crudo de <i>L. casei</i> 95.	112

Figura 38. Evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones colectadas por HPLC a partir del extracto crudo de <i>L. casei</i> 26.	113
Figura 39. Espectro de masa (MS) obtenido por MALDI-TOF correspondiente al compuesto anticlostridial producido por BAL C.	114
Figura 40. Espectro de masa (MS) obtenido por MALDI-TOF de la fracción P4 colectada en la técnica de RP-HPLC perteneciente a <i>L. casei</i> 95.	116
Figura 41. Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con $m/z = 1162,5178$ de la fracción P ₄ perteneciente a <i>L. casei</i> 95.	117
Figura 42. Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con $m/z = 1291,5745$ de la fracción P ₄ perteneciente a <i>L. casei</i> 95.	118
Figura 43. Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con $m/z = 1425,6570$ de la fracción P ₄ perteneciente a <i>L. casei</i> 95.	118
Figura 44. Acción inhibitoria de la nisina sobre <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755.	120
Figura 45. Comparación de la actividad inhibitoria producida por las fracciones de HPLC de BAL C (P ₀), <i>L. casei</i> 26 (P ₂ y P ₄) y <i>L. casei</i> 95 (P ₁ y P ₄) respecto a la nisina.	121
Figura 46. Crecimiento de las cepas 26, 95 y 76 en tubos de caldo MRS adicionado con lisozima (Lz).	122
Figura 47. Evaluación en placa de la sensibilidad de las cepas 26, 95 y 76 a la lisozima.	123
Figura 48. Inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755 por lisozima en placa de agar RCM.	124
Figura 49. Placas en que se compararon las actividades anticlostridiales de la lisozima con la presentada por los sobrenadantes de las cepas 26, 95 y 76, sobrenadante de BAL C y la combinación de sobrenadante y lisozima.	125
Figura 50. Comparación del diámetro de los halos de inhibición producidos por: sobrenadantes de las cepas 26, 95, 76 y BAL C, solución de lisozima (0.75mg/mL) y mezcla de los sobrenadantes con lisozima.	126
Figura 51. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 26.	134
Figura 52. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. butyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 26.	135
Figura 53. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. beijerinckii</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 26.	136
Figura 54. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. sporogenes</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 26.	137

Figura 55. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	138
Figura 56. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. butyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	139
Figura 57. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. beijerinckii</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	140
Figura 58. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. sporogenes</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76.	141
Figura 59. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 95.	142
Figura 60. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. butyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 95.	143
Figura 61. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. beijerinckii</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 95.	144
Figura 62. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. sporogenes</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> 95.	145
Figura 63. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> BAL C.	146
Figura 64. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. butyricum</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> BAL C.	147
Figura 65. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. beijerinckii</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> BAL C.	148
Figura 66. Análisis estadístico realizado a los datos de inhibición de <i>C. sporogenes</i> en presencia del sobrenadante de <i>L. casei</i> BAL C.	149
Figura 67. Análisis estadístico de los datos de inhibición de <i>C. tyrobutyricum</i> en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.	150
Figura 68. Análisis estadístico de los datos de inhibición de <i>C. butyricum</i> en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.	151
Figura 69. Análisis estadístico de los datos de inhibición de <i>C. beijerinckii</i> en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.	152
Figura 70. Análisis estadístico de los datos de inhibición de <i>C. sporogenes</i> en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.	153

Figura 71. Cromatograma correspondiente a línea de base (caldo MRS).	154
Figura 72. Cromatograma obtenido para el extracto crudo de BAL C.	155
Figura 73. Cromatograma obtenido para el extracto crudo de <i>L. casei</i> 95.	156
Figura 74. Cromatograma obtenido para el extracto crudo de <i>L. casei</i> 26.	157

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los quesos de acuerdo al contenido de humedad (% MFFB).	19
Tabla 2. Clasificación de los quesos de acuerdo al tiempo de maduración y el tamaño de éstos (peso de la horma).	20
Tabla 3. Condiciones fisicoquímicas compatibles con el crecimiento de las especies de <i>Clostridium</i> causantes de hinchazón tardía.	27
Tabla 4. Principales especies y subespecies de LAB y NSLAB presentes en quesos.	46
Tabla 5. Variantes de nisina conocidas.	60
Tabla 6. Total de cepas de LAB y NSLAB provenientes de leche, queso y suero lácteo.	79
Tabla 7. Aislamientos agrupados según el diámetro de sus halos de inhibición.	81
Tabla 8. Aislamientos LAB y NSLAB seleccionados por los métodos de difusión en hoyos y doble capa.	83
Tabla 9. Número de cepas de LAB y NSLAB con actividad anticlostridial aisladas en leche, queso y suero lácteo.	85
Tabla 10. Actividad anticlostridial remanente (%) producida por los sobrenadantes (SN) neutralizados y tratados de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.	92
Tabla 11. Cuadro resumen de los mecanismos de inhibición identificados para las siete cepas en estudio.	96
Tabla 12. Valores de T_D de las cepas BAL evaluadas.	96
Tabla 13. Diámetro (cm) de los halos de inhibición de los sobrenadantes neutralizados obtenidos a las horas 24 y 48 de las cinéticas de crecimiento de <i>L. casei</i> 26 y <i>L. casei</i> 95.	99
Tabla 14. Fracciones de HPLC obtenidas a partir de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26 y 95.	113
Tabla 15. Identificación de cepas LAB y NSLAB por secuenciación del gen del ARNr 16S.	130

Resumen

La producción quesera de Uruguay genera un ingreso anual de 128.894 millones de dólares en exportaciones. De los quesos exportados el 63.3% son de textura dura y semidura. En estas variedades la principal causa de deterioro es la “hinchazón tardía” producida por el desarrollo de *Clostridium* spp. en la etapa de maduración. Dicho defecto se caracteriza por la formación de ojos irregulares, rajaduras, malos sabores y aromas. Los productos afectados tienen menor valor comercial porque se destinan al fundido o la elaboración de queso rallado. Los métodos empleados por la industria quesera no controlan totalmente el desarrollo de estos microorganismos, por lo que es necesario aplicar estrategias alternativas, por ejemplo emplear cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) anticlostridiales como cultivos bioprotectores en la elaboración de quesos.

El presente trabajo tuvo por objetivo obtener aislamientos de LAB y NSLAB nativos de queserías artesanales, con capacidad inhibitoria sobre las principales especies de *Clostridium* spp. de deterioro de productos lácteos. A partir de 130 cepas de BAL aisladas, 56 presentaron actividad anticlostridial. Siete aislamientos con máxima capacidad antibacteriana fueron seleccionados para determinar sus mecanismos de inhibición contra *C. tyrobutyricum*. La actividad inhibitoria de cuatro de las cepas seleccionadas (23, 24, 29 y 104) se debió a la producción de acidez. La inhibición generada por las cepas 26 y 95 de *L. casei* se debió a la producción de acidez, peróxido de hidrógeno y bacteriocina. La actividad anticlostridial de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (76) fue causada por acidez y peróxido de hidrógeno.

Se evaluó la actividad inhibitoria de sobrenadantes de las cepas 26, 76 y 95 contra cepas de *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* y *C. butyricum* autóctonas de productos lácteos y se comparó con la producida por una cepa comercial de *L. casei* (BAL C). De acuerdo a los resultados obtenidos, los tres aislamientos inhibieron a todas las cepas consideradas. El aislamiento 95 generó la mayor acción inhibitoria contra *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes*. La cepa BAL C presentó la máxima capacidad antibacteriana contra *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. El sobrenadante del aislamiento 76 tuvo actividad inhibitoria contra *C. sporogenes* similar a la cepa BAL C, pero fue el que menos inhibición ejerció sobre *C. tyrobutyricum*.

Se estudió la compatibilidad de las cepas 26, 76 y 95 con distintas concentraciones de lisozima, que es empleada por la industria quesera para prevenir el desarrollo de *Clostridium* spp.. Los tres aislamientos no fueron susceptibles a las concentraciones de lisozima consideradas. Por otra parte, se comparó la acción inhibitoria de las cepas evaluadas respecto a BAL C y lisozima, determinándose que la cepa comercial y la lisozima presentaron la mayor actividad anticlostridial. Además existió sinergismo entre los metabolitos inhibitorios producidos por las cepas estudiadas y la lisozima.

Por otra parte, se determinó que los compuestos antibacterianos producidos por las cepas 26 y 95 fueron termoestables. Éstos se purificaron mediante HPLC de fase reversa, obteniéndose en ambos casos dos fracciones con actividad anticlostridial. Para *L. casei* 95 se pudo determinar que el peso molecular de uno de sus metabolitos inhibitorios mediante espectrometría de masa MALDI-TOF y correspondió a 1162.52 Da, pudiendo tratarse de una bacteriocina.

La actividad inhibitoria de las fracciones de HPLC fue comparada con la generada por la bacteriocina purificada de BAL C y la nisina. De acuerdo a los resultados obtenidos, la bacteriocina de BAL C y la nisina ejercieron mayor acción anticlostridial que las fracciones pertenecientes a las cepas 26 y 95. Asimismo, las pertenecientes a *L. casei* (26) produjeron más inhibición que las de *L. casei* (95).

Abreviaciones

3-HPA: β -hidroxipropionaldehído

Abs: Absorbancia

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

DPA: *Dipicolinic Acid*

GRAS: *Generally Regarded As Safe*

HMT: Hexametilentetramina

HTST: *High-Temperature-Short-Time*

LAB: *Lactic Acid Bacteria*

LPL: Lipoproteín Lipasa

LTLT: *Low-Temperature-Long-Time*

MFFB: *Moisture on a Free-Fat Basis*

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*

MRS: de Man, Rogosa, Sharpe *medium*

NMP: Número Más Probable

NSLAB: *Non-Starter Lactic Acid Bacteria*

OH-PLA: ácido 4-hidroxi-fenil-láctico

OTA: Ocratoxina A

PABA: *p*-aminobenzoato

PLA: ácido 3-fenil-láctico

RCM: *Reinforced Clostridium Medium*

SASP: *Small Acid-Soluble Proteins*

SN: Sobrenadante

STC: Esterigmatocistina

UHT: *Ultra-High Temperature*

1. Introducción

1.1 Quesos: definición y proceso de elaboración

El queso es un producto lácteo fermentado altamente diversificado, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO -) puede ser definido como “el producto fresco o madurado obtenido por el drenado de líquido (suero lácteo) resultante de la coagulación de la leche, nata, leche desnatado o parcialmente desnatada, suero de manteca o cualquier combinación de éstos productos” cuya elaboración se puede separar en tres etapas principales: formación del gel también denominado cuajada, deshidratación o sinéresis de la cuajada y proceso de maduración (Button y Dutton, 2012; Jiménez, 2010).

Las proteínas de la leche denominadas caseínas en estado nativo se encuentran organizadas en micelas constituidas por cuatro tipos mayoritarios: α -S₁, α -S₂, β y κ -caseína. La coagulación de la leche en la producción quesera se debe a la floculación de dichas micelas y origina una estructura tipo gel en la que quedan retenidos grasa, agua, lactosa y minerales. Los métodos empleados para coagular la leche pueden ser: acidificación, proteólisis, coagulación mixta que es una combinación de acidificación y proteólisis y combinación de acidificación y tratamiento térmico. Dichos tratamientos difieren en su intensidad por lo que producen cuajadas con distintos grados de firmeza e influye en la dureza del queso. La mayoría de los quesos se producen por acidificación o por coagulación mixta (Kapoor y Metzger, 2008; Fox, 2011).

La acidificación de la leche es producida por bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de la leche o aquellas que la industria quesera adiciona con dicha finalidad conocidas como “cultivos iniciadores”, “*starters*” o “fermentos”. Las BAL fermentan la lactosa generando ácido láctico que provoca el descenso del pH de la leche. Cuando el pH alcanza el punto isoelectrónico de las micelas de caseínas (pH 4.6) ocurre la precipitación de las micelas. Además a medida que la acidificación progresa ocurre liberación de iones Ca²⁺ de las micelas que interactúan con la red de cargas negativas que éstas presentan, estableciéndose enlaces entre micelas que promueven la floculación (McMahon y Oommen, 2013; Fox et al., 2015). Existen quesos como el Cottage y Quark en los cuales la coagulación de la leche ocurre exclusivamente por acidificación, en general se trata de quesos frescos, es decir, carentes de etapa de maduración y usualmente empleados como componentes de otros productos como salsas o pastas “dips”. Por otra parte, son pocas las variedades elaboradas por acidificación y tratamiento térmico de la leche, por ejemplo los quesos Blanco y Paneer. Este tipo de coagulación consiste en acidificar la leche hasta pH 5.2 – 5.5, para desestabilizar las micelas de caseínas, y calentarla a 80 - 90 °C para que las proteínas séricas se desnaturalicen y establezcan interacciones entre micelas promoviendo la formación de la matriz proteica (Fox, 2011; Barlow et al., 2014; Almena-Aliste y Mietton, 2014)

La mayoría de los quesos, 75% de la producción mundial, se elaboran por coagulación mixta (Figura 1) que comprende el proceso de acidificación explicado y la incorporación de cuajo que consiste en proteinasas de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico que degradan las caseínas promoviendo la pérdida de repulsión electrostática entre las micelas y la consecuente formación de la cuajada. Dicho proceso ocurre más rápidamente que la coagulación por acidez y produce cuajadas con mayor capacidad de desuerado (sinéresis). En consecuencia, los quesos obtenidos tienen menor contenido de humedad por lo que son más estables. Tradicionalmente se ha empleado la enzima quimosina

proveniente del cuarto estómago (abomaso) del ternero porque la proteólisis generada otorga mejores propiedades organolépticas al queso en comparación a otros tipos de cuajos. La quimosina actúa sobre las κ -caseínas responsables de la solubilidad de las micelas de caseínas. Esta enzima hidroliza específicamente el enlace entre Phe₁₀₅ y Met₁₀₆ provocando la pérdida en el suero de la porción hidrofílica de la κ -caseína llamada glicomacropéptido, provocando un descenso de la carga iónica neta de las micelas y pérdida del agua de hidratación por lo que las micelas se desestabilizan y exponen las α -S₁, α -S₂ y β caseínas cuyos residuos de fosfoserina quedan entrecruzados al establecer enlaces con iones Ca^{2+} resultando en la formación de la cuajada.

Dada la importancia de los iones Ca^{2+} para la aglomeración de las micelas de caseína, se suele agregar a la leche cloruro de calcio que aporta mayor contenido de iones Ca^{2+} , de esta forma se acelera el tiempo de coagulación de la leche y aumenta el rendimiento quesero. Con respecto a los quesos obtenidos por coagulación estrictamente proteolítica es importante aclarar que también existe desarrollo de acidez por bacterias ácido lácticas autóctonas de la leche y las provenientes del ambiente de la industria quesera, sin embargo su impacto en la precipitación de las caseínas es secundario (Qi, 2007; Kapoor y Metzger, 2008; Jiménez, 2010; Fox, 2011; Button y Dutton, 2012).

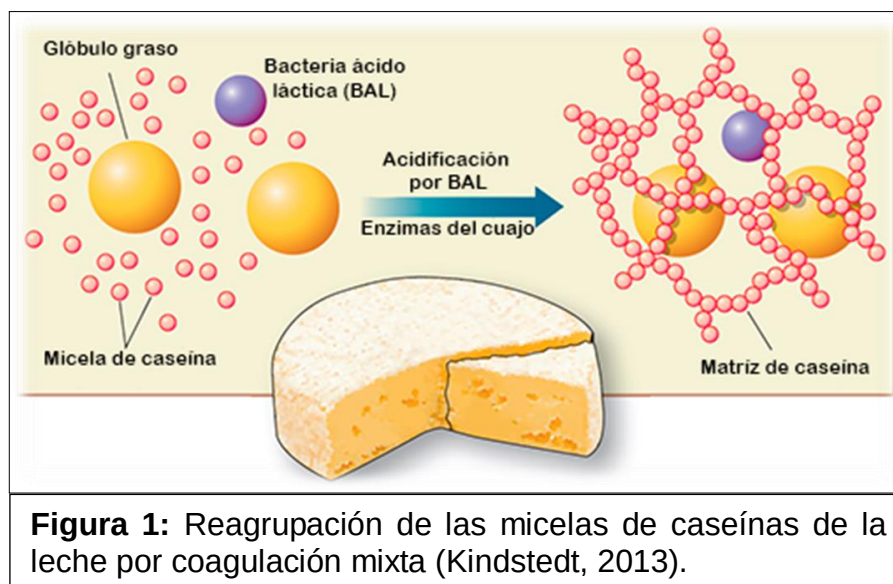


Figura 1: Reagrupación de las micelas de caseínas de la leche por coagulación mixta (Kindstedt, 2013).

La siguiente etapa de la producción quesera es el desuerado o sinéresis de la cuajada y consiste en eliminar el remanente de lactosuero que constituye el 95% del agua presente en la leche, lográndose una concentración de la caseína y grasa en un factor de 6 a 12. Esta pérdida espontánea de agua se debe a la deshidratación de las micelas de caseína y la consecuente contracción del gel. Para favorecer su ocurrencia la cuajada es cortada en cubos también denominados gránulos y luego drenada, moldeada, prensada y salada (Jiménez, 2010; Sbodio y Revelli, 2012).

Cabe mencionar que en la elaboración de algunos tipos de quesos la cuajada es sometida a un proceso de cocción luego de ser cortada. Para la mayoría de los quesos holandeses y algunas variedades suizas como Danbo, Samsø y Havarti el tratamiento se realiza sustituyendo parte del suero lácteo liberado en el corte por agua a la temperatura requerida, en otros quesos que incluyen esta etapa la misma se efectúa inyectando vapor a la tina quesera o en tanque con doble camisa por la que pasa vapor o agua a dicha

temperatura (Daly et al., 2010; Guinee y O'Callaghan, 2010).

La cocción de la cuajada favorece la eliminación de agua de la cuajada por contracción de los granos de cuajada, obteniéndose quesos con menor contenido de humedad, asimismo la producción de ácido láctico y el descenso del pH provocado son menores por la pérdida de lactosa junto con el suero lácteo liberado. En algunas variedades también sirve para reducir la producción de acidez por el cultivo *starter* al someter la cuajada a una temperatura superior a la óptima para su desarrollo, en estos casos una vez que desciende la temperatura las BAL retoman su actividad acidificante. La temperatura de cocción empleada depende del tipo de queso a elaborar, contenido de humedad deseado y la temperatura óptima de crecimiento del cultivo *starter*. En quesos de estilo Holandés el tratamiento se suele efectuar a 36 °C, en Cheddar a 38 °C, en quesos suizos a 52 - 54 °C durante más de 1 hora mientras que en las variedades extra-duras de estilo italiano la cocción se realiza a 55 - 57 °C y luego la temperatura desciende lentamente (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2008; Guinee y O'Callaghan, 2010; Kindstedt, Hillier y Mayes, 2010; Fox et al., 2017).

Por otra parte en los quesos denominados de pasta hilada o *pasta filata* la cuajada obtenida es sometida a ≥ 65 °C con agua o suero caliente mientras es amasada y estirada hasta obtener una textura fibrosa, maleable y elástica. Los ejemplos más conocidos de este tipo de quesos son de origen italiano como Mozzarella, Provolone, Caciocavallo y Ragusano, pero existen variedades en otros países, por ejemplo Oaxaca, Asadero y Guaje en México, Kasseri en Grecia, Momposino, Huilense y Pera de Colombia, Kashar de Turquía y Kachkaval de Serbia (Ramírez-Nolla y Vélez-Ruiz, 2012; Chandan, 2014; Fox et al., 2017; Licitra et al., 2017).

El moldeado y prensado también confieren la forma al queso y ayudan a que los gránulos de cuajada se compacten. El salado junto con la sinéresis logran reducir el contenido de humedad del queso, en consecuencia regulan la microflora capaz de desarrollarse y la actividad de las enzimas liberadas por autólisis bacteriana por tanto regulan los cambios bioquímicos que ocurren en el queso. Como resultado de ambos procesos aumenta la vida útil y la seguridad alimentaria del producto. Además el salado del queso contribuye al sabor y la formación de la corteza. Existen tres formas de salar los quesos: inmersión del queso en salmuera, mezclar la cuajada con sal o aplicación de sal seca en la superficie del queso, la elección del método de salado depende de la variedad de queso a elaborar (Fox, 2011; Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012; Chandan, 2014).

En la mayoría de los quesos el salado se realiza por inmersión en salmuera cuya concentración varía según la variedad. Como resultado de esta operación se establece un gradiente salino desde la superficie del queso hacia el interior del mismo que depende del tamaño del queso, concentración salina y temperatura de la salmuera, así como el tiempo que el queso permanece inmerso. Las salmueras empleadas en el proceso de inmersión tienen entre 20 a 22 °Bé (grados Beaumé) de sal. Los quesos salados de esta forma frecuentemente tienen 1.2 a 2.0 % de sal para que no afecte el crecimiento de las cepas de bacterias ácido lácticas responsables de la fermentación de la lactosa, también conocidas como cepas de BAL iniciadoras o LAB, y éstas puedan catabolizar este carbohidrato durante los primeros días de la maduración. La mayoría de las BAL soportan menos del 4% de sal (Kristensen et al., 2005; Jakob, 2011; Ruusunen et al., 2012; Fox et al., 2017).

La maduración constituye la última etapa de la elaboración quesera. Se trata de un proceso en el cual ocurre una serie de cambios bioquímicos que dependen de varios

factores del proceso de manufactura, principalmente el contenido de NaCl y humedad, pH, actividad del coagulante remanente, la temperatura en las etapas iniciales de la elaboración quesera y del proceso de maduración, el tipo de cultivo iniciador empleado y la microflora adicionada conocida como cultivo adjunto secundaria y la adventicia. Este procedimiento resulta en un aporte de sabor, aroma y mejora de la textura del queso. Para ello los quesos se mantienen en cámaras de humedad y temperaturas controladas que para la mayoría de los quesos se encuentran en un rango entre 5 y 15 °C (cámara templada-fría) para promover las reacciones de maduración, permitir el desarrollo controlado de la microflora secundaria pero evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes.

Es importante indicar que las temperaturas empleadas a lo largo de la producción quesera buscan promover el crecimiento de cepas BAL iniciadoras durante la fermentación y NSLAB (non starter lactic bacteria) u otros microorganismos en la etapa de maduración para que aporten las características típicas al producto final, a la vez que evitar la proliferación de microorganismos alterantes y patógenos. Asimismo la temperatura es regulada para controlar los procesos de proteólisis, lipólisis y glucólisis que tienen lugar en el queso para lograr las características típicas. En la maduración industrial quesera suele emplear temperaturas más elevadas para acelerar los procesos, reducir los tiempos de maduración y disminuir los gastos económicos. Sin embargo también pueden obtenerse productos cuya textura y “flavor” son de menor calidad. A su vez el empleo de temperaturas más bajas es una forma de reducir el desarrollo de bacterias ácido butíricas y la ocurrencia de hinchazón tardía tal como se explica en el ítem 1.7 (McSweeney, 2007).

El tiempo de maduración varía de 15 días hasta más de 2 años dependiendo del queso elaborado. También existen quesos llamados frescos que no son sometidos a esta etapa finalizando su elaboración con el desuerado de la cuajada. Este parámetro es particularmente importante en los quesos elaborados con leche cruda que alcanzan los 60 días de maduración, porque el predominio de las bacterias ácido lácticas no iniciadoras o adjuntas (non starter lactic bacteria -NSLAB-) en la microflora del queso, la producción de compuestos antimicrobianos por cepas de bacterias ácido lácticas iniciadoras (lactic acid bacteria -LAB-) y NSLAB así como las condiciones fisicoquímicas alcanzadas en el queso conforman un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos patógenos. Debido a esto se considera que los quesos con igual o mayor tiempo de maduración son microbiológicamente seguro para su consumo (Fox, 2011; Button y Dotton, 2012; Peralta, 2014; Martins et al., 2015).

Una de las transformaciones que ocurre en el estadio temprano de la maduración es la fermentación completa de la lactosa por las bacterias ácido lácticas iniciadoras (LAB), si la lactosa no es completamente consumida el remanente es catabolizado por las cepas NSLAB que son nativas de la leche o adventicias del ambiente de producción lechera y las instalaciones de elaboración quesera. Además la fermentación heteroláctica realizada por las NSLAB produce compuestos que impactan en el sabor como ácido fórmico y ácido acético. Las NSLAB se convierten en la microflora dominante durante la maduración y tienen un rol central en los procesos de proteólisis y lipólisis que se desarrollan a lo largo de esta etapa (Fox, 2011; Kongo, 2013; Pagthinathan y Nafees, 2015).

La proteólisis se debe a proteinasas y peptidasas secretadas en la matriz del queso por LAB y NSLAB y las liberadas por autólisis de LAB. Así mismo la plasmina una enzima nativa de la leche y el coagulante residual siguen actuando en esta etapa. La degradación proteica tiene efecto en la estructura del queso y en el sabor, ya que se generan péptidos y aminoácidos que contribuyen al “flavor” (aroma y sabor) del producto y los péptidos

amargos son degradados. Por otra parte las NSLAB también pueden catabolizar aminoácidos y generar compuestos aromáticos volátiles como aldehídos, ácidos carboxílicos, alcoholes, compuestos azufrados y amoníaco (Peralta, 2014; Pagthinathan y Nafees, 2015).

La lipólisis consiste en la hidrólisis de los triglicéridos por lipasas de origen microbiano, la enzima nativa de la leche lipoproteín lipasa (LPL) y lipasas presentes en el cuajo. Esta reacción origina ácidos grasos libres, siendo los ácidos grasos de C₄ a C₁₀ los que influyen en el sabor del queso, así mismo mediante el catabolismo de los ácidos grasos libres se producen compuestos aromáticos volátiles como metil-cetonas, lactonas y alcoholes que también afectan el “flavor” del producto. La lipólisis de origen microbiano se debe a cepas de LAB, NSLAB y otros microorganismos de la microflora secundaria, siendo los hongos los que presentan mayor actividad lipolítica, por lo cual en quesos madurados con hongos existe alto grado de lipólisis. Las cepas de BAL a pesar de generar baja o moderada lipólisis, contribuyen en forma significativa porque las lipasas liberadas en la autólisis de las cepas conservan su actividad biológica en la matriz del queso. Asimismo, las NSLAB alcanzan altos recuentos durante la etapa de maduración por lo que acentúan el proceso (Peralta 2014; Pagthinathan y Nafees, 2015).

La fermentación del citrato disponible en la cuajada es otro proceso que tiene lugar en la maduración y es fundamental para el desarrollo del “flavor” y la formación de ojos en quesos tipo Holandés y Suizos. Esta fermentación produce compuestos aromáticos (acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol) responsables del aroma y sabor, así como CO₂ que se acumula en la masa de queso formando los ojos. En los de estilo Holandés los microorganismos empleados para fermentar el citrato son cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp. como *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. En cambio en las variedades suizas estas características son aportadas por cepas de bacterias ácido propiónicas pertenecientes a *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* o *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, que se adicionan como cultivos adjuntos (*starters* secundarios) y producen ácido propiónico, acético y CO₂ a partir del lactato generado por las cepas LAB.

Las bacterias ácido propiónicas suelen producir mayor cantidad de CO₂ que las BAL heterofermentativas lo que explica la presencia de ojos más grandes en quesos Suizos que de estilo Holandés. Asimismo, *Propionibacterium* spp. genera ácidos grasos por lipólisis y compuestos volátiles de cadena ramificada por el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, que también contribuyen al perfil de aroma y sabor de este estilo de quesos, que se caracterizan por su sabor dulce y anuezado. A diferencia de la mayoría de los quesos, los de estilo Suizo tienen una etapa de maduración a una temperatura entre 18 - 25 °C (cámara caliente) para promover el desarrollo de dichas bacterias y posteriormente se transfieren a cámara templada-fría. Estos quesos son tradicionalmente moldeados en forma de grandes ruedas lo que sumado al salado en salmuera favorece a que la difusión de la sal en la masa sea lenta y permita el crecimiento de *Propionibacterium* spp. en la etapa temprana de la maduración (El Soda y Awad, 2014; Thierry et al., 2010; Dherbécourt et al., 2008; McSweeney, 2007; Hassan et al., 2013; Dunge, 2016; Fox et al, 2017; Nyberg, 2016) En la Figura 2 se observan las etapas de la línea de producción para quesos madurados.

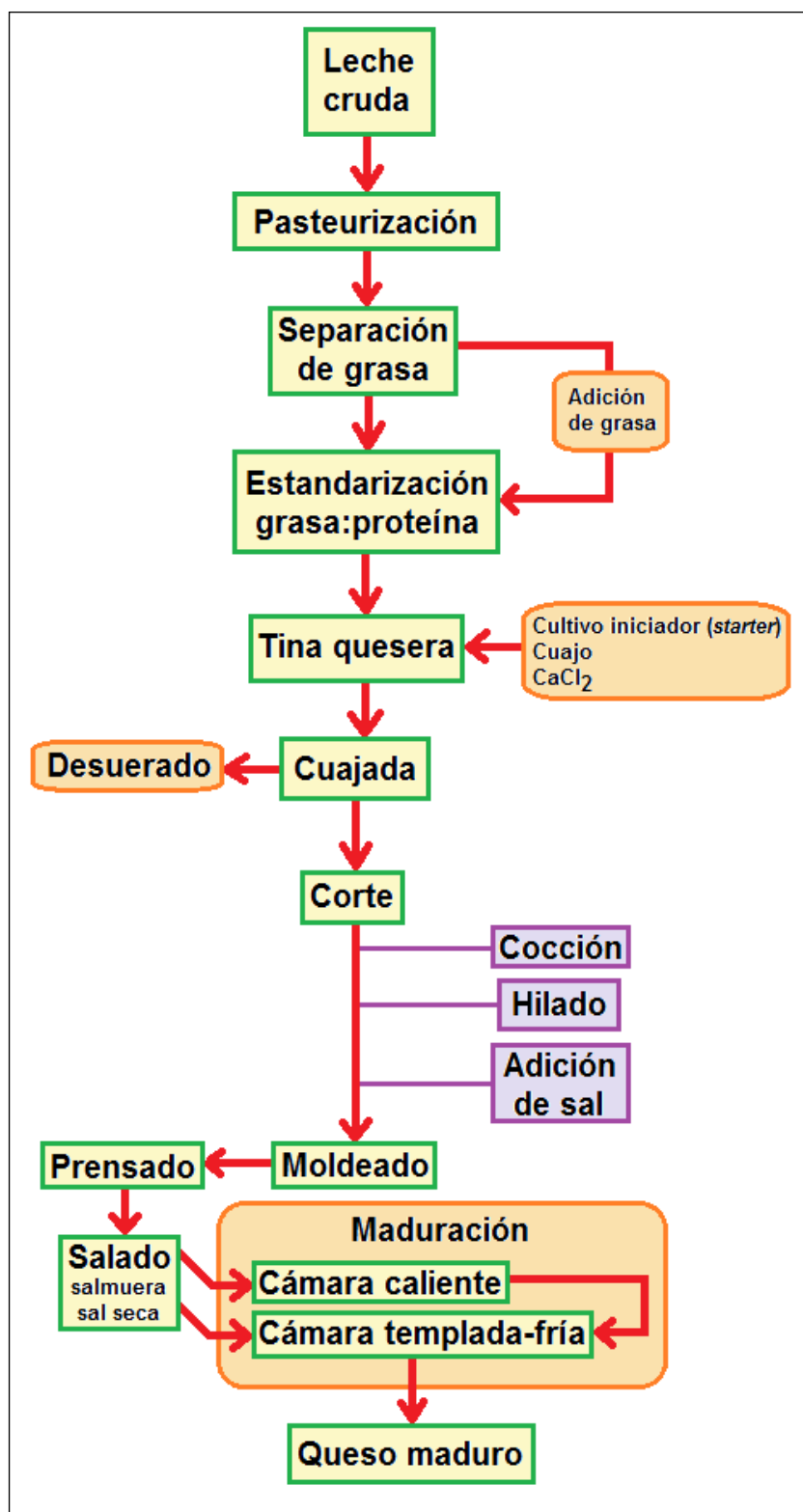


Figura 2: Etapas de la producción quesera en la elaboración de quesos madurados. En violeta se muestran los procesos adicionales más comúnmente efectuados en algunas variedades como son la cocción, el hilado y la adición de sal a la cuajada, ésta última operación realizada en queso tipo Cheddar (Kristesen et al., 2005).

1.2 Clasificación de quesos

Existen más de 1000 variedades de quesos a nivel mundial e incluso a nivel de un mismo tipo de queso hay variantes locales. La gran diversidad de productos se debe al tipo de leche empleada (oveja, cabra, vaca, búfala o mezclas de las anteriores) así como la variación en los procesos tecnológicos: los diferentes métodos de coagulación de la leche, forma de salado, el tiempo de maduración, la modificación de otros parámetros involucrados en dichos procesos y la posibilidad de realizar tratamientos adicionales tales como el tratamiento térmico de la cuajada para favorecer su desuerado. Esto plantea limitaciones en los criterios de clasificación existentes ya que frecuentemente en una misma categoría quedan incluidos quesos que difieren en otras propiedades. Algunos de los parámetros usualmente empleados para la clasificación de los quesos son: contenido de materia grasa, dureza del queso, duración y tipo de maduración (González, 2010; Fox, 2011; Almendra-Aliste y Miettton, 2014).

La dureza del queso está asociada al contenido de humedad de éste y depende en gran medida del tiempo de maduración, cuanto más prolongada es esta etapa menor humedad y mayor dureza tiene el queso. Debido a ello para determinar la dureza de los quesos se suele determinar el contenido de humedad como porcentaje de humedad sobre base libre de grasa (*percentage Moisture on a Free-Fat Basis* -% MFFB-), esto es el cociente entre el peso de la humedad del queso y la diferencia existente entre el peso del queso y el peso de la grasa del queso. En base a este parámetro los quesos son clasificados en: blandos, semiblandos o semiduros, duros y extraduros (Gobetti, 2004; McSweeney et al., 2004; Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012; Chandan, 2014; MAGyP, 2015; Eugster et al., 2017; Fox et al., 2017). La Tabla 1 presenta dicha clasificación y ejemplos comprendidos dentro de cada categoría.

Tabla 1: Clasificación de los quesos de acuerdo al contenido de humedad (% MFFB). Adaptado de Chandan, 2014.		
Categoría	% MFFB	Ejemplos
Blandos	> 67%	Brie, Camembert, Blanco, Cottage, Feta, Panela, Quark, Tetilla, Mozzarella, Caprice des Dieux, Finn, Saint André, Vacherol, Saint-Honoré, Pannerone
Semiblandos o semiduros	54 a 69 %	Edam, Gouda, Fontina, Colonia, Tilsit, Raclette, Provolone, Serrano, Prato, Münster, Serra da Estrela, Limburger, São Jorge, Colby, Kraftkar, Havarti, Domiati, Roquefort, Stilton, Port Salut
Duros	49 a 56 %	Gruyère, Comté, Emmental, Caciocavallo, Cheddar, Chihuahua, Cotija, Leyden, Ragusano, Matos Saint George
Extraduros	< 56%	Sbrinz, Parmigiano-Reggiano, Pecorino Romano, Grana Padano, Asiago, Montasio, Roncal, Cheshire, Gamalost

Dependiendo si los quesos presentan o no etapa de maduración son diferenciados en: frescos o madurados. A su vez los quesos madurados se pueden clasificar según sus tiempos de maduración en: tiernos, semicurados, curados, viejos o añejos (García, 2006; de Fátima y Pintado, 2010; Fox, 2011; Merino, 2012; Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012; García et al., 2016; Eugster et al., 2017). La Tabla 2 muestra esta clasificación indicando para cada clase de queso el tiempo de maduración asociado de acuerdo al peso de la

forma como indicador del tamaño del mismo.

Tabla 2: Clasificación de los quesos de acuerdo al tiempo de maduración y el tamaño de éstos (peso de la horma). Adaptado de Merino, 2012.			
Tiempo de maduración	Quesos ≤ 1.5 Kg	Quesos > 1.5 Kg	Ejemplos
Frescos	< 7 días	< 7 días	Cottage, Queso Crema, Blanco, Panela, Quark, Mozzarella
Tiernos	7 - 20 días	7 - 35 días	Chihuahua, Serrano, Mozzarella, Cotija, Tetilla, Caprice des Dieux, Finn, Pannerone, Feta, Port du Salud, Romadur, Bavaria Blu, Bergader
Semicurados	20 - 45 días	35 - 105 días	Prato, Camembert, Münster, Serra da Estrela, Brie, Colby, Saint-Honoré, Saint André, Domiati, Bachensteiner, Caciotta Romana, Cheshire, Ol Sciur, Saint Paulin, Cal Pujole, Sharpam Rustic
Curados	45 - 100 días	105 - 180 días	Edam, Gouda, Roquefort, Limburger, Tilsit, Raclette, Vacherol, Urdina, Windsor Blue, Dolcelatte, Cornish Blue, Lou Pennol
Viejos	100 días o más	180 - 270 días	Colonia, Emmental, Grana Padano, Gruyère, São Jorge, Provolone, Kraftkar
Añejos	-----	≥ 270 días	Caciocavallo, Parmigiano-Reggiano, Pecorino Romano, Asiago, Montasio, Stilton, Cheddar, Roncal, Leyden, Comté, Ragusano

1.3 Defectos en quesos.

Los defectos microbiológicos en los quesos se deben a microorganismos de deterioro presentes en la leche cruda o que logran contaminar los quesos en alguna de las etapas de la elaboración, soportan el proceso de manufactura y son capaces de desarrollarse durante la maduración provocando alteraciones en las características organolépticas, de apariencia en la corteza o en el interior del queso. La proliferación y el grado de deterioro producido dependen de la carga microbiana, presencia y tipo de microorganismos competitivos en el queso, las características fisicoquímicas desarrolladas en el queso y las condiciones de maduración. Asimismo los quesos elaborados a partir de leche cruda sin tratar térmicamente o sometida a procesos de menor intensidad que la pasteurización, presentan diferencias en el tipo de microorganismos que pueden crecer y generar problemas respecto a los producidos con leche pasteurizada, en la cual se elimina la mayoría de la microflora alterante (Walstra et al., 1993; Braunig y Hall, 2005; Librán, 2013;

Alvenäs, 2015).

Un defecto muy frecuente en los quesos es la hinchazón de los mismos por producción anormal de gas. De acuerdo a la etapa de la maduración en la que ocurre y los microorganismos responsables de ésta la hinchazón se puede distinguir en temprana o tardía. La hinchazón temprana es comúnmente detectable a los dos días de maduración que frecuentemente se debe al crecimiento de bacterias coliformes como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Proteus*, en forma menos frecuente al desarrollo de *Bacillus* spp. o levaduras como *Kluyveromyces* spp. y *Saccharomyces* spp. Independientemente del microorganismo causante éste fermenta la lactosa remanente en la cuajada generando CO₂ y H₂, dando como resultado numerosos ojos pequeños, textura esponjosa y puede conferir aromas atípicos. La incidencia de este defecto puede reducirse empleando cultivos *starters* que logren la rápida acidificación de la cuajada para reducir el pH y el contenido de lactosa. En el caso de los coliformes dado que la pasteurización de la leche los destruye, el desarrollo de estos microorganismos y la aparición de hinchazón temprana en quesos elaborados con leche pasteurizada se deben a una contaminación post-pasteurización, por ejemplo por *Enterobacter aerogenes*.

La ocurrencia de hinchazón temprana por levaduras es mayor si en la elaboración quesera se utilizan cepas de BAL iniciadoras galactosa-negativas, por ejemplo: *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis*, y las levaduras contaminantes fermentan galactosa. En estas condiciones existe más galactosa disponible que las levaduras catabolizan liberando mayor cantidad de CO₂. Por otra parte, en quesos envasados al vacío o bajo atmósfera modificada la cantidad de CO₂ producida por las levaduras puede hinchar el envase (Ledenbach y Marshall, 2009; Alvenäs, 2015).

También ocurren casos de hinchazón temprana por bacterias ácido lácticas, principalmente cepas de *Lactobacillus* heterofermentativas capaces de metabolizar la galactosa residual y producir grandes cantidades de CO₂. Por otra parte ciertas cepas iniciadoras pertenecientes a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* que fermentan citrato y *Streptococcus thermophilus* con actividad ureasa pueden generar CO₂ en exceso y provocar esta alteración cuando se desarrollan desbalances entre especies o cepas en la preparación de los cultivos o durante las etapas iniciales de la elaboración quesera (Walstra et al., 1993; Braunig y Hall, 2005; Sheehan, 2011; Mullan, 2012; Santarelli, 2012; Librán, 2013).

La hinchazón tardía en cambio se manifiesta en quesos maduros duros o semiduros y suele ser detectada entre el primer y segundo mes de maduración, aunque dependiendo de las características fisicoquímicas puede presentarse entre los 10 días hasta 5 meses. Este defecto se debe principalmente al desarrollo de *Clostridium* spp. que fermentan el ácido láctico generando CO₂ y H₂, responsables de la hinchazón al producir ojos irregulares, grietas o rajaduras en la masa del queso, además de ácido butírico y acético que alteran el sabor y aroma del mismo (Walstra et al., 1993; Braunig y Hall, 2005; Palacios, 2006; Librán, 2013).

Por otra parte, cepas de bacterias ácido lácticas heterofermentativas mesófilas y halotolerantes principalmente *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp. se han asociado a casos de hinchazón tardía. Se ha propuesto como forma de prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía por NSLAB emplear cultivos *starters* con baja actividad acidificante capaces de permanecer más tiempo viables en los quesos y en consecuencia evitar la temprana predominancia de las NSLAB. Las bacterias ácido propiónicas que son empleadas en quesos tipo Suizo para la formación de ojos también pueden generar este

defecto si hay un desarrollo excesivo, esto ocurre cuando la velocidad de acidificación y la difusión salina dentro del queso son muy lentas y si la maduración se realiza a temperaturas inferiores a las existentes en cámara de maduración caliente, además se requiere un tiempo de maduración prolongado (Braunig y Hall, 2005; Sheehan, 2011; Librán, 2013; Alvenäs, 2015).

Otros defectos en quesos están asociados al desarrollo de hongos en su superficie. Los hongos contaminantes más frecuentes pertenecen a los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Monilia*. Algunas de las alteraciones que producen son manchas pigmentadas en la corteza del queso, olores amoniacales, afrutados o a moho (Braunig y Hall, 2005; Ledenbach y Marshall, 2009). Muchos hongos también producen micotoxinas especialmente la Ocratoxina A (OTA), Esterigmatocistina (STC) y las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Braunig y Hall, 2005; Palacios, 2006; Abdell et al., 2008; Hymery et al., 2014).

Las levaduras también pueden provocar alteraciones en el aroma y sabor de los quesos, sobretodo las pertenecientes a las especies alterantes: *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichium candidum*, *Kluyveromyces marxianus* y *Picchia* spp.. Otro defecto que ha sido asociado al crecimiento de estos microorganismos es la decoloración de los quesos (Ledenbach y Marshall, 2009; Alvenäs, 2015).

Las bacterias psicrótrofas o psicotolerantes son contaminantes habituales de la leche cruda que en su mayoría son eliminadas por pasteurización, pero existen especies productoras de enzimas termoestables, principalmente proteasas y lipasas capaces de soportar tratamientos de ultra-alta temperatura (*Ultra-High Temperature* -UHT-) realizados a: 130 - 150 °C entre 2 y 10 seg. y generan deterioro de la leche. Los quesos también son afectados porque adquieren mal sabor debido a péptidos amargos originados en la proteólisis, mientras que las lipasas liberan ácidos grasos que generan sabor rancio en los quesos (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007; Nsofor y Frank, 2013; de Oliveira et al., 2015; Erkmen y Bozoglu, 2016).

Por otra parte, ciertas cepas de BAL pueden generar alteraciones. La aparición de cristales blancos en la superficie de quesos madurados es un defecto producido por algunas NSLAB que racemizan el ácido L(+)-láctico resultante de la fermentación ácido láctica a D(-)-lactato, ambos isómeros precipitan con iones Ca²⁺ produciendo cristales de lactato de calcio que no afectan el sabor del producto, pero provocan el rechazo del consumidor (Clark y Agarwal, 2012; Erkmen y Bozoglu, 2016; Reginensi et al., 2016).

Otra alteración en quesos madurados es la aparición de coloración rosada amarronada a marrón oscuro en la corteza o por debajo de esta. El cambio de coloración puede ocurrir cuando se adiciona anato como colorante, cuyos componentes son afectados por factores como el pH y la temperatura. Otras causas son la ocurrencia de reacción de pardeamiento de Maillard y la presencia de cepas termófilas de *Lactobacillus*, como las pertenecientes a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *helveticus*, así como de bacterias ácido propiónicas (Daly et al., 2012; Quigley et al., 2016).

Ciertas cepas de *Leuconostoc* y *Lactobacillus* son capaces de metabolizar la tirosina y generar coloración rosada a marrón dependiendo de la concentración de O₂ en la corteza del queso (Ledenbach y Marshall, 2009). Este defecto en quesos Cheddar se atribuyó a las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* empleadas como cultivo *starter*. También se ha propuesto que en los quesos en los cuales *S. thermophilus* se emplea como cultivo iniciador, ocurre acumulación de galactosa por ser

una bacteria galactosa-negativa. La galactosa establece una reacción de Maillard con péptidos y aminoácidos producidos en la proteólisis, originándose el compuesto de coloración. Por otra parte las BAL pueden generar productos intermediarios de las reacciones de Maillard que favorecen la aparición de la alteración (Daly, McSweeney y Sheehan, 2012; Quigley et al., 2016). Además de los microorganismos ya citados *Yarrowia lipolytica*, *Candida* spp. y *Brevibacterium linens* están asociados a la obtención de quesos con pigmentación rosada o rojiza (Daly et al., 2012).

La presencia de compuestos fenólicos de origen microbiano es considerada otra de las causas de este defecto. Además estos compuestos producen cambios en el “flavor”. En queso Cheddar se han detectado cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* y *L. casei* subsp. *rhannosus* productoras de este tipo de compuestos, otras BAL generalmente de *Lactococcus* spp. producen ésteres que deterioran los quesos al aportar sabores frutales (Nsofor y Frank, 2013; Erkmén y Bozoglu, 2016).

1.4 Defecto de hinchazón tardía

1.4.1 Generalidades

Las esporas del género *Clostridium* son ubicuas del suelo, ensilados, agua, heces de los animales y otros ambientes del tambo, siendo capaces de contaminar la leche cruda, soportar el proceso de pasteurización y manufactura y llegar al producto final (Ingham et al., 1998). Como se discutirá más adelante varios de los tratamientos térmicos a los que se somete la leche o la cuajada durante la producción quesera pueden activar la germinación de las esporas y promover el crecimiento bacteriano (Mato y Alatosava, 2010). De acuerdo a Raats et al. (2011) el género *Clostridium* es uno de los grupos más abundantes en silos refrigerados presentes en las plantas lácteas e incluso lo considera un género psicrotolerante.

En relación a la alimentación del ganado, los ensilados, especialmente los de baja calidad y otros tipos de ración constituyen las fuentes de contaminación más importantes de la leche cruda con esporas de *Clostridium* (Vissers et al., 2006, Vissers, 2007; Julien et al., 2008) que pueden transferirse a la leche durante el proceso de ordeño, especialmente cuando las prácticas de higiene no reducen la carga de esporas presentes en la superficie de los pezones (Vissers et al., 2007). Se ha propuesto la detección de esporas de *Clostridium* spp. en leche cruda como un indicador de las condiciones de higiene a nivel del tambo debido a su presencia en el intestino de animales y humanos (aprox. 100 esporas/g de heces) (Food Risk Assessment group, 2014).

En quesos duros y semiduros, ciertas especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*) son las principales responsables del defecto denominado “hinchazón tardía” que constituye la forma de deterioro más importante en este tipo de quesos, el cual reduce su calidad y valor comercial (Garde et al., 2013; Bermúdez et al., 2016). Durante la etapa de maduración quesera, las esporas de *Clostridium* spp. germinan y las células vegetativas metabolizan el lactato por fermentación ácido butírica y dependiendo de la especie también metabolizan azúcares residuales y citrato, produciendo gases (CO₂ y H₂) cuya acumulación genera ojos irregulares, grietas y aperturas, así como ácidos orgánicos, principalmente butirato y acetato que aportan aroma desagradable y sabor rancio al producto. En la Figura 3 se muestra alteraciones en hormas de quesos asociadas a la hinchazón tardía (McSweeney,

2007; Guinee y O'Callaghan, 2010; Sheehan, 2011).

Este defecto suele producirse entre las dos y ocho semanas de maduración, aunque en algunos quesos como el Gouda puede manifestarse a los 10 días y en ciertas variedades de tipo Suizo luego de varios meses de elaborados, porque el proceso de manufactura afecta las condiciones fisicoquímicas volviéndolas más favorables o adversas para el crecimiento de *Clostridium* spp. (ver ítem 1.4.2 - Factores que afectan el desarrollo de hinchazón tardía). Además, aunque es menos frecuente, la hinchazón tardía puede afectar quesos con poco tiempo de maduración como el Cheddar (Fernandes, 2009; Arias, 2013). Esta alteración es generalmente detectada entre el primer y segundo mes de elaboración ya que el queso pierde gran parte de su elasticidad temprana por el proceso de proteólisis que tiene lugar durante la maduración, acumulándose los gases resultantes de la fermentación (McSweeney, 2007; Guinee y O'Callaghan, 2010; Sheehan, 2011; Gómez-Torres et al., 2015; Soggiu et al., 2016; Bermúdez et al., 2016).



Figura 3: Fotos de quesos afectados por hinchazón tardía. Las alteraciones producidas pueden ser ojos irregulares, rajaduras y abombamiento de la horma (Jakob, 2011; Saito, 2014; Alvenas, 2015).

Las cuatro especies no tienen la misma incidencia en el problema, *C. tyrobutyricum* es la especie aislada con mayor frecuencia de los productos afectados, por lo cual es considerada la principal especie responsable mientras que a las restantes contribuyen en forma secundaria (Schöbitz et al. 2005; Driehuis et al., 2016). En muchos quesos con hinchazón tardía elaborados con leche bovina se suelen detectar solamente cepas de *C.*

tyrobutyricum, siendo el único responsable de esta alteración. Esto es posible debido a su mayor tolerancia a la acidez respecto a otras bacterias ácido butíricas (Brändle et al., 2016). Sin embargo las investigaciones realizadas en queso Manchego que es elaborado con leche ovina (Garde et al., 2011a; Arias et al., 2013) determinaron que *C. sporogenes* era la especie predominante. Al respecto Garde et al. (2011a) atribuyeron dicho resultado a la elevada presencia de *C. sporogenes* en la leche empleada. Por otra parte el mismo trabajo evidenció que al cultivar *C. beijerinckii* en lactosa o en lactato produce mayor cantidad de gas respecto a las cepas de *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* aisladas.

Según Arias et al. (2013) *C. beijerinckii* fue la segunda especie en orden de predominancia. Las diferencias encontradas entre quesos con hinchazón tardía de origen bovino y ovino han llevado a sugerir que si bien *C. tyrobutyricum* es esencial para la ocurrencia del defecto, en presencia de *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* se establece un efecto sinérgico que aumenta la fermentación butírica realizada por *C. tyrobutyricum*. Otra hipótesis planteada es que la producción de gas no es especie-dependiente sino genotipo-dependientes. En base a estos fenómenos resulta evidente que el defecto de hinchazón tardía no se puede atribuir al metabolismo de una única especie predominante sino al conjunto de las especies presentes en el queso (Arias, 2013; Garde et al., 2011a,b; Le Bourhis et al., 2007).

En referencia a la importancia de las restantes especies, según Le Bourhis et al. (2007), Garde et al. (2011a,b) y Gómez-Torres et al. (2015) éstas producen defectos menos severos que *C. tyrobutyricum*. La mayoría de las cepas de *C. butyricum* no fermentan lactato pero son capaces de utilizar la lactosa como fuente de energía. Hay pocos casos de hinchazón tardía provocados por *C. butyricum* debido a su baja tolerancia a la acidez y concentración de sal en el queso y el requerimiento de carbohidratos que en las condiciones de maduración se encuentran ausentes. En los quesos afectados que generalmente son quesos italianos como el Grana Padano, las bacterias ácido lácticas empleadas como cultivos iniciadores no fermentan completamente la lactosa, quedando un remanente que es utilizado por esta especie, generando aperturas en la etapa temprana de la maduración. *C. beijerinckii* es una especie con requerimientos nutricionales complejos que tampoco puede fermentar lactato. En quesos de oveja, Arias et al. (2013) encontraron que *C. beijerinckii* y *C. tyrobutyricum* son las mayores productoras de gas.

C. sporogenes es una especie altamente proteolítica y productora de gases y olores desagradables, incluso en ciertos quesos como el Emmental puede producir puntos o manchas pálidas. Al igual que *C. butyricum* es capaz de generar elevados niveles de aminoácidos y aumentar el pH del queso si la proteólisis es intensa, lo que favorece el desarrollo de otras especies de *Clostridium*, especialmente *C. tyrobutyricum* (Gupta y Brightwell, 2017). Con respecto a su actividad metabólica, aunque puede fermentar lactato y piruvato, cataboliza preferentemente aminoácidos. De acuerdo a Garde et al. (2011a) y Arias et al. (2013) *C. sporogenes* es la especie más abundante en leche ovina empleada para la elaboración de queso Manchego en el cual es la especie predominante (Brändle et al., 2016).

Le Bourhis et al. (2007) determinaron en quesos que *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* a pesar de encontrarse en menor cantidad y ser metabólicamente menos activos que *C. tyrobutyricum* estimulan la fermentación butírica y los defectos producidos por éste último. Se ha propuesto que *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* generan metabolitos que estimulan el crecimiento de *C. tyrobutyricum*, mientras que esta especie desacidifica el queso favoreciendo el incremento de la actividad metabólica de las anteriores (Doyle et al., 2015;

Brändle et al., 2016). Cabe mencionar que las especies *C. pasteurianum*, *C. tertium*, *C. bifermentans*, *C. perfringens* y *C. tetanomorphum* también han sido detectadas en quesos con hinchazón tardía y leche cruda aunque con menor frecuencia que las anteriormente mencionadas (Cremonesi et al., 2012; Feligini et al., 2014; Reindl et al., 2014; Bermúdez et al., 2016; Brändle et al., 2016).

1.4.2 Factores que afectan el desarrollo de hinchazón tardía

La ocurrencia de hinchazón tardía depende de la carga de esporas y las especies de *Clostridium* que contaminan la leche cruda, el proceso de manufactura del queso y las características del producto final. A su vez las prácticas de manejo en el tambo son factores importantes que afectan la cantidad de esporas presentes en leche cruda (ver ítem 1.9) (Oliveira et al., 2016). A pesar que la carga de esporas es un factor crítico, la carga mínima requerida para la ocurrencia de este defecto no ha sido establecida ya que las investigaciones realizadas difieren entre sí. Dasgupta y Hull (1989) determinaron que 25 esporas/ml de leche es suficiente para el desarrollo del defecto en queso Suizo. En cambio Summer et al. (2014) correlacionaron la presencia de hinchazón tardía en queso Parmigiano-Reggiano con recuentos mayores a 100 esporas/L de leche cruda. Según Garde et al. (2013) la presencia de 50 a 1000 esporas por litro de leche es suficiente para inducir esta alteración. Mientras que en los trabajos de Klijn et al. (1995), Bachmann (1999) y Doyle et al. (2015) se reporta que 50 esporas/litro de leche es capaz de provocar esta alteración.

La disparidad entre los valores reportados en los distintos estudios realizados como concentración mínima necesaria para el desarrollo de hinchazón tardía puede atribuirse en parte a la variedad de queso analizado. En ciertos tipos de quesos aunque el recuento de esporas se sitúe por debajo del valor crítico si los parámetros fisicoquímicos del producto y/o el proceso de elaboración son propicios para el crecimiento de *Clostridium* spp. pueden conducir a la ocurrencia del defecto (Klantschitsch, 1999). A pesar que las distintas investigaciones difieren en la carga crítica de esporulados anaeróbios necesaria para la aparición de esta alteración, la cantidad de esporas reportada por todos los autores es baja; esto se debe a que las esporas se concentran en la masa del queso como resultado de la sinéresis que tiene lugar una vez obtenida la cuajada y durante las etapas de prensado y maduración de los quesos (Ledenbach y Marshall, 2009).

Tampoco se puede ignorar que las concentraciones mencionadas por los distintos autores se encuentran afectadas por el poder de detección de los respectivos métodos de cuantificación empleados. Al mismo tiempo el bajo número de esporas clostridiales presentes en la leche cruda y la baja carga requerida para la ocurrencia de este defecto exigen que el grado de sensibilidad de los métodos disponibles sea el mayor posible. De éstos el método del Número Más Probable (NMP) es el más utilizado en los trabajos de investigación y el que la industria quesera emplea para evaluar la concentración de anaeróbios estrictos a lo largo de la línea de producción (Bassi et al., 2013; Morandi et al., 2015; Brändle et al., 2016; Eklund, 2017).

Por otra parte, el impacto de la carga de esporas está influenciada por las especies presentes, en el caso de *C. tyrobutyricum*, principal responsable de esta alteración, la carga no debe exceder de 100 o 200 esporas/L de leche cruda. Los quesos con hinchazón tardía causada por esta especie suele presentar 10^1 a 10^7 esporas/gramo de queso. También es difícil correlacionar la carga de esporas presentes en la leche con la ocurrencia de este defecto puesto que la germinación de éstas y la posterior proliferación

de las células vegetativas dependen de los procesos a los que se somete la leche durante la elaboración quesera y de las características fisicoquímicas del producto final. En consecuencia la carga de esporas necesaria para la ocurrencia de esta alteración varía según el tipo de queso. Por ejemplo en queso Gouda 5 a 10 esporas/L de leche son suficientes para generar hinchazón tardía (Su e Ingham, 2000; Ivy y Wiedmann, 2014; Oliveira et al., 2016; Eklund, 2017).

Varios parámetros del proceso de elaboración quesera condicionan el desarrollo de las bacterias ácido butíricas en los quesos producidos. Los principales son la concentración de ácido láctico, pH de la masa del queso, concentración de sal, contenido de grasa y aminoácidos, humedad, temperatura y tiempo de maduración del queso, así como forma, tamaño y textura del producto que afectan la velocidad de difusión de la sal en la masa del queso y la presencia de otros microorganismos que influyen en el crecimiento de *Clostridium* spp. (Klantschitsch, 1999; Garde et al., 2011a; Morandi et al., 2015; Oliveira et al., 2016). Respecto a este último punto, se sabe que algunas especies de BAL, por ejemplo *S. thermophilus*, estimulan la proliferación de *Clostridium* spp. al producir L-lactato (Oliveira et al., 2016). Un estudio realizado en quesos por Bassi et al. (2015) encontró que en los quesos en los cuales *C. tyrobutyricum* fue el principal contaminante presentaron altos recuentos de *S. thermophilus* y *L. rhamnosus*, mientras que en los quesos donde *C. butyricum* fue dominante, *Lactobacillus delbrueckii* fue la especie predominante. También se sabe que *C. tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp. estimulan su crecimiento recíprocamente en la matriz del queso (Brändle et al., 2016). Otros trabajos han determinado que la presencia de bacterias coliformes en los quesos estimula el crecimiento de *Clostridium* (Gómez-Torres et al., 2014; Garde et al., 2018).

También es importante la tasa de acidificación de las cepas BAL nativas de la leche y las adicionadas como cultivos *starters*, existiendo correlación entre la presencia de hinchazón tardía y tasas de acidificación demasiado lentas. La capacidad de las esporas de *Clostridium* spp. de germinar y proliferar durante la etapa de maduración de los quesos duros y semiduros se debe a que éstos alcanzan valores de pH entre 5.0 y 6.0, niveles de actividad de agua (a_w) de 0.95 a 0.97% y contenido de sal entre 0.7 y 2.0 %. Como se aprecia en la Tabla 3 dichas condiciones son compatibles con el desarrollo de las especies mencionadas (Aureli et al., 2011; Jakob, 2011; Masset et al., 2012; Raney et al., 2015; Alvenäs, 2015).

Tabla 3: Condiciones fisicoquímicas compatibles con el crecimiento de las especies de *Clostridium* causantes de hinchazón tardía. La tabla también indica la capacidad fermentadora sobre lactosa y lactato así como la actividad proteolítica (Raney et al., 2015).

Especie	a_w mínima	Concentración de NaCl máxima (%)	pH mínimo	pH óptimo	Temperatura de crecimiento (°C)	lactato	lactosa	proteólisis
<i>C. butyricum</i>	0,97	< 5%	≥4,8	6,5	10 - 37	- (+)	+	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i>	0,96	< 6%	4,2 - 4,8	5,0 - 5,9	10 - 37	+	-	-
<i>C. sporogenes</i>	0,95	≤ 6%	5,0 - 5,8	6,0 - 7,5	25 - 45	+	-	++
<i>C. beijerinckii</i>	0,96	< 6%	≥4,8	6,5 - 6,8	25 - 45	- (+)	+	-

El salado por inmersión es una de las causas de la incidencia de este defecto, porque la concentración de sal resultante no es homogénea en toda la masa del queso, existiendo

mayor contenido de sal en la superficie del mismo que va disminuyendo hacia el centro del mismo, donde la presencia de oxígeno también es mínima. La combinación de ambas condiciones es propicia para el crecimiento de *Clostridium* spp.. En este tipo de salazón la tasa de difusión del NaCl en la masa del queso es baja por lo que el NaCl puede demorar semanas en distribuirse en todo el queso, dando tiempo a que estos microorganismos se desarrollen. La manera en que se puede aumentar la tasa de difusión de la sal y reducir el tiempo del salado es manteniendo la salmuera a mayor temperatura y utilizando concentraciones más elevadas de NaCl. En cambio los quesos salados en seco o por agregado de sal a la cuajada como ocurre en la elaboración del queso Cheddar son menos susceptibles a desarrollar este defecto (Bachmann et al., 2011; Chandan, 2014; Huc et al., 2014; Alvenäs, 2015; Fox et al., 2015; Fox et al., 2017).

Por otra parte, los procesos térmicos a los que se somete a la leche promueven la activación y germinación de las esporas de *Clostridium* spp. al producir compuestos más fáciles de asimilar, destruir microorganismos antagónicos y provocar el descenso del potencial redox (Gaggiotti, Calvino y Reinheimer, 2006). Estos tratamientos comprenden la termización y pasteurización de leche previos a la elaboración quesera, así como el proceso de cocción de la cuajada que se realiza en ciertos tipos de quesos. La termización es un tratamiento térmico de 63 - 65 °C durante 15 a 20 seg. o 57 - 58 °C por 15 seg., luego de la cual la leche es rápidamente enfriada por debajo de 7 °C. La finalidad de la termización es destruir las bacterias psicrótrofas Gram-negativas presentes en leche cruda, las cuales se desarrollan a temperatura de refrigeración y producen lipasas, proteasas y fosfolipasas termoresistentes que conducen a defectos de sabor, aroma y textura en los productos elaborados. Al reducirse la carga de bacterias psicrótrofas, la producción de enzimas termoresistentes es menor, lo que permite extender la vida útil de la leche cruda en refrigeración (te Giffel y Wells-Bennik, 2010; Doyle et al., 2015; Şenel y Gürsoy, 2015; Lu y Wang, 2017).

La pasteurización es un proceso térmico realizado para destruir los microorganismos patógenos y la mayor parte de la microflora contaminante de la leche con el fin de garantizar la seguridad microbiológica y el mantenimiento de su calidad inicial. Existen dos tipos de pasteurización: baja temperatura/largo tiempo (LTLT) y alta temperatura/corto tiempo (HTST). El proceso LTLT consiste en someter la leche a 63 °C durante 30 min. y su empleo es más frecuente a nivel artesanal, en cambio el tratamiento HTST que se realiza entre 72 a 74 °C por 15 a 30 seg. es utilizado por la industria. Es importante indicar que la pasteurización tiene efecto sobre microorganismos termosensibles. Por este proceso las bacterias ácido butíricas en estado vegetativo son destruidas pero las esporas no sólo lo soportan sino que son activadas para iniciar el proceso de germinación (te Giffel y Wells-Bennik, 2010; Doyle et al., 2015; Şenel y Gürsoy, 2015; Lu y Wang, 2017).

La temperatura de maduración también influye en la aparición de hinchazón tardía. El mantenimiento de los quesos a temperaturas inferiores permite reducir la germinación de esporas clostridiales y posterior crecimiento celular. Un estudio realizado en quesos Gouda elaborados a partir de leche contaminada con esporas de *C. tyrobutyricum* constató este defecto luego de ser madurados a 15 °C por 22 días, mientras que el mismo tipo de queso producidos de igual manera pero mantenidos por tres semanas a 7 °C y posteriormente 12 semanas a 15 °C no presentaron problemas de hinchazón tardía (Su e Ingham, 2000).

Dentro de la variedad de quesos semiduros y duros existen ciertos quesos que son particularmente propensos a sufrir hinchazón tardía, estos son los Suizos como Emmental, Gruyere y Suizo y los tipo Holandés, por ejemplo Gouda y Edam, debido a su

pH y humedad relativamente elevados, bajo contenido de sal que facilitan el crecimiento de *Clostridium* spp. y la cocción de la cuajada que promueve la activación de las esporas clostridiales al realizarse a temperaturas mayores a 45 °C. En los quesos tipo Suizo se suma a lo anterior que el tratamiento de cocción es más intenso y que luego de realizado la cuajada se mantiene a 50 °C por varias horas, además la maduración se realiza a mayor temperatura (ver ítem 1.1 - Quesos: definición y proceso de elaboración). En este tipo de quesos también hay que considerar como factor promotor del desarrollo de *Clostridium* spp. que el salado es menos intenso empleándose salmueras con menor contenido de sal (0.3 - 0.7 %) debido a la gran sensibilidad de las bacterias ácido propiónicas al NaCl, además que las hormas elaboradas son de gran tamaño para enlentecer la difusión de la sal en la masa (Ledenbach y Marshall, 2009; Guinee y O'Callaghan, 2010; Chandan, 2014; Alvenäs, 2015).

Otro factor que promueve el crecimiento de *Clostridium* spp. en quesos suizos es el pH relativamente alto de estas variedades que no puede ser inferior a 4.6 porque no permite el crecimiento de *Propionibacterium* spp.. A modo de información el pH en el queso Emmental luego de la etapa de fermentación es 5.2 - 5.3, condición soportada por las especies causantes del defecto. Por otra parte, los quesos extra-duros italianos como el Grana Padano y el Parmigiano Reggiano si bien suelen alcanzar pH menores a 5.2 luego de 24 h. de elaborados, también son propensos a sufrir hinchazón tardía por la elevada temperatura de cocción de la cuajada (55 - 57 °C) y el prolongado tiempo de maduración, que en algunas variedades puede extenderse más de 2 años (Food Standards, 2009; Guinee y O'Callaghan, 2010; Skeie, 2010; Bachmann et al., 2011; Chandan, 2014; Huc et al., 2014; Alvenäs, 2015).

Cabe indicar que en quesos de larga maduración la proteólisis puede tornarse excesiva y aportar un sabor exageradamente amargo. Además, los aminoácidos liberados aumentan el pH del queso resultando más propicio para la proliferación de las bacterias ácido butíricas (Ledenbach y Marshall, 2009; Oliveira et al., 2016).

1.5 Características del género *Clostridium*.

Los miembros del género *Clostridium* son bacterias Gram-positivas anaerobias estrictas que en su mayoría se encuentran como células planctónicas que no toleran la presencia de oxígeno. Aunque existen especies como *C. perfringens* que en biofilms son capaces de soportar el oxígeno y crecer. Estos microorganismos son formadores de esporas con disposición central o terminal que suelen deformar el cuerpo celular. Las esporas presentan alta resistencia a las condiciones químicas y físicas adversas, siendo capaces de sobrevivir por largo tiempo en el ambiente hasta que las condiciones vuelven a ser adecuadas para el crecimiento celular. La morfología celular es cilíndrica recta o curvada, con acumulación de vesículas de almacenamiento de amilopectina denominadas granulosas. La mayoría de las especies son móviles por presencia de flagelo peritrico. El contenido de guanina y citosina (G+C %) en su genoma se ubica entre 22 y 54 mol%. El rango de pH óptimo para el crecimiento abarca de 6.5 a 7.0 (Rainey et al., 2009; Aureli et al., 2011; Blaschek, 2014; Al-Hinai et al., 2015; Doyle et al., 2015; Mortensen y Graeter, 2015).

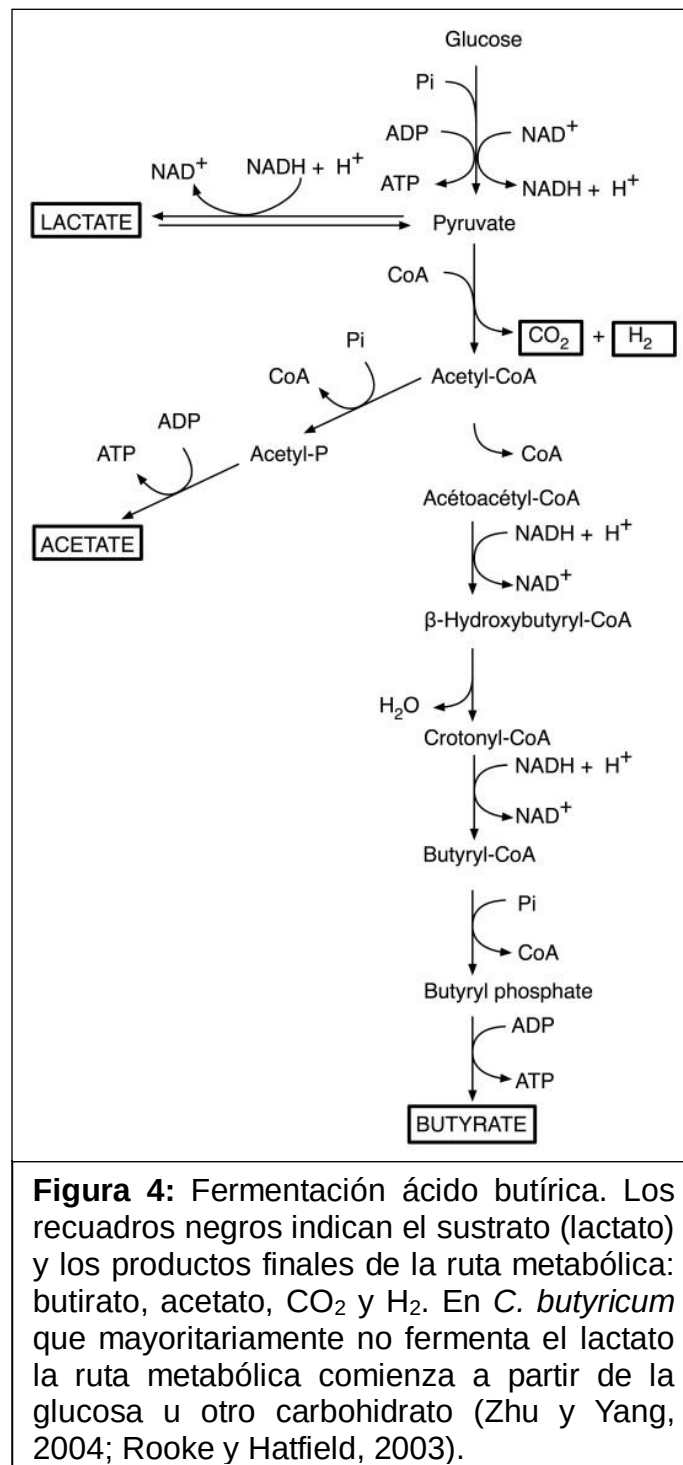
El rango de temperatura en el cual *Clostridium* spp. suele presentar crecimiento abarca de 3.3 a 80 °C con una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 40 °C. De acuerdo al rango óptimo para el crecimiento estos microorganismos son considerados mesófilos pero

dado que son capaces de crecer por debajo de 5 °C muchos investigadores los consideran un género psicrotolerante, incluso algunos autores los definen como microorganismos psicrotróficos (Adam et al., 2010; de Oliveira et al., 2015; Doyle et al., 2015; Smith y Johnson, 2015). Según Raats et al. (2011) y Doyle et al. (2015) el género *Clostridium* se encuentra dentro de los grupos bacterianos más abundantes en los silos refrigerados de las plantas lácteas.

De acuerdo a los requerimientos nutricionales y el pH mínimo compatible con el crecimiento celular los miembros de este género se pueden agrupar en tres categorías designadas: Grupo I, II o III (Drouin y Lafrenière, 2012; Driehuis, 2013; Beechey-Gradwell, 2016). El grupo I está conformado por especies proteolíticas como *C. sporogenes*, *C. tetanomorphum*, *C. bifermentans* y *C. perfringens* que preferentemente obtienen energía por la fermentación de aminoácidos mediante la vía de Stickland aunque pueden catabolizar carbohidratos (excepto *C. sporogenes* y *C. bifermentans*). En presencia de aminoácidos, el catabolismo de carbohidratos es capaz de estimular el crecimiento celular (Poehlein et al., 2015). Esta ruta metabólica se caracteriza por la fermentación de pares de aminoácidos, de los cuales uno es susceptible a la oxidación, y el otro a la reducción. Comúnmente los aminoácidos oxidables son valina, leucina, alanina, isoleucina, serina y treonina, mientras que los reducibles son prolina, ácido aspártico y glicina (de Vladar, 2012). Como resultado de esta fermentación los miembros de este grupo producen ácido acético y otros ácidos orgánicos dependiendo de los aminoácidos fermentados, CO₂, etanol, amidas, así como amonio y aminas que provocan el aumento del pH. Este grupo prolifera cuando el pH es superior a 5,0. (Khanal, 2009).

El Grupo II comprende a las especies sacarolíticas con nula o escasa actividad proteolítica como *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. tertium*. Se caracterizan por la gran variedad de carbohidratos que pueden fermentar aunque también pueden catabolizar ácidos orgánicos, produciendo ácido butírico y acético y los gases CO₂ y H₂. Los integrantes de esta categoría se desarrollan a pH superior a 4.5. Con respecto al Grupo III también denominado grupo del *C. tyrobutyricum* está conformado por especies capaces de catabolizar un número limitado de azúcares y fermentan preferentemente ácidos orgánicos como el ácido láctico y generan ácido butírico y acético y los gases CO₂ y H₂. Este grupo presenta crecimiento a valores de pH por encima de 4.2 (Knický, 2005; Müller, 2012; Hafner et al., 2013).

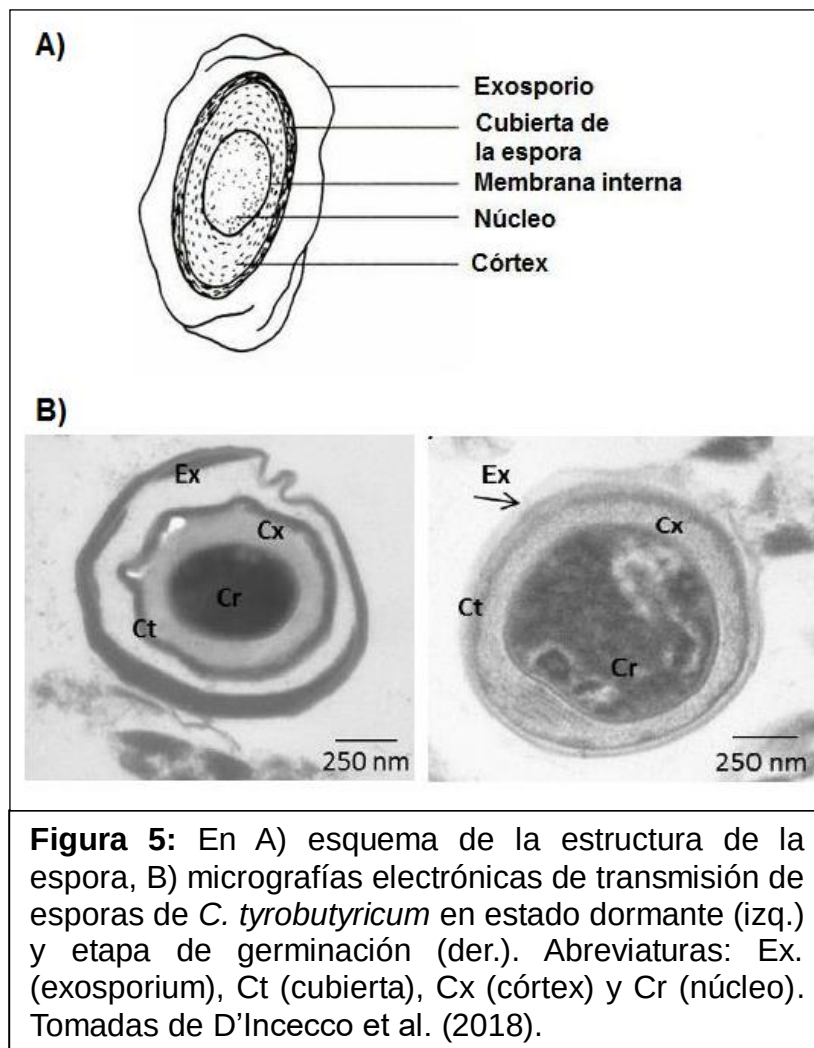
Es importante señalar que el desarrollo de *C. tyrobutyricum* u otros miembros del grupo III facilita inicialmente el crecimiento de las especies sacarolíticas y posteriormente el de las proteolíticas ya que la conversión del ácido láctico a ácido butírico asociado al catabolismo producido por estos microorganismos provoca aumento del pH pudiendo alcanzar valores compatibles con el crecimiento celular de los integrantes de los grupos II y I (Beechey-Gradwell, 2016). En la Figura 4 está representada la fermentación ácido butírica presente en las especies del Grupo II y III.



1.6 Esporulación y germinación en *Clostridium* spp.

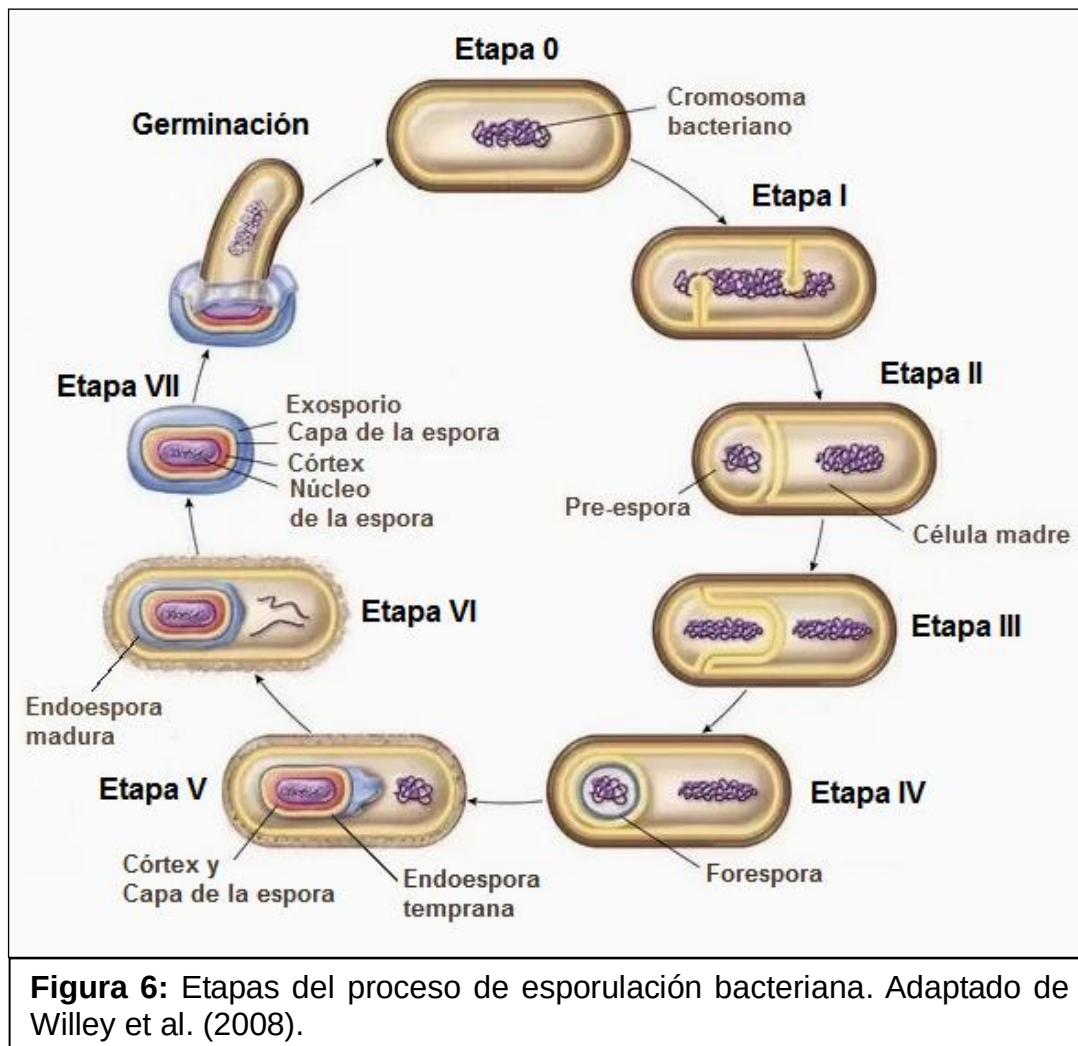
Las esporas son estructuras de resistencia que le permiten a las bacterias soportar condiciones hostiles de pH, radiación UV, temperatura, carencia de nutrientes, baja a_w , presencia de antibióticos, entre otras, manteniéndose metabólicamente latentes hasta que las condiciones vuelven a ser adecuadas para el crecimiento celular. La estructura de la espora está conservada en la mayoría de las bacterias Gram-positivas y consta de un núcleo en el que se encuentra el ADN genómico asociado a proteínas pequeñas solubles en ácido (small acid-soluble proteins -SASP-) y ácido dipicolínico-Ca²⁺ (DPA-Ca²⁺).

Rodeando al núcleo se encuentra la membrana interna de la espora que consta de receptores de germinación (receptores Ger). Alrededor de ésta existe una pared de peptidoglicano delgada denominada pared celular germinal y una pared de peptidoglicano más gruesa llamada córtex. Una membrana externa rodea al córtex y sirve de anclaje para la cubierta de la espora. Asimismo, algunas especies presentan una cubierta adicional denominada exosporium (Francis y Sorg, 2016). La Figura 5 muestra un esquema de la estructura de la espora y una micrografía electrónica de transmisión de la misma. La resistencia de las esporas al estrés físico y químico se debe a la capa de la espora, la poca permeabilidad de la membrana celular interna, bajo contenido de agua en la espora, las SASP que al asociarse al ADN reducen su reactividad química y a la luz UV, mientras que la elevada concentración de DPA- Ca^{2+} excluye el agua del núcleo de la espora disminuyendo su termosensibilidad (Talukdar et al., 2014; Francis y Sorg, 2016).



La esporulación es un fenómeno irreversible y energéticamente costoso para el microorganismo por lo que debe estar altamente regulado. De acuerdo a los estudios realizados en *Bacillus* spp. la carencia de nutrientes, densidad celular y el estadio del ciclo celular son los parámetros que controlan el inicio del proceso. En *Clostridium* también hay evidencias de la baja disponibilidad de nutrientes como parámetro de control de la esporulación, aunque no se descartan otros factores de estrés como la exposición al oxígeno (Pérez y Montoya, 2013; Al-Hinai et al., 2015). En todas las bacterias formadoras

de esporas el proceso consta de siete etapas morfológicas, I a VII, que son similares para todas ellas y ocurren a partir de la etapa 0 en la cual la célula en estado vegetativo toma la decisión de iniciar el programa de esporulación. La Figura 6 esquematiza los siete estadios.



En la fase I el cromosoma bacteriano se replica y las copias se separan axialmente. Además, en *Clostridium* hay acumulación de granulosa que sirve como fuente de carbono y energía durante la formación de la endoespora, esto genera el hinchamiento característico de las células conocido como “estado clostridial”. A continuación (etapa II) la célula se divide en dos compartimentos asimétricos denominados pre-espora y célula madre, separados por un septum y ocurre la transferencia del ADN duplicado a la pre-espora.

En la fase III la célula madre incorpora a la pre-espora que pasa a llamarse forespora, la cual está compuesta por el protoplasto, región central que contiene el ADN y dos membranas celulares que lo envuelven. Durante la etapa IV la célula madre sintetiza dos capas de peptidoglicano entre la membrana interna y externa de la forespora, denominadas pared celular germinal y córtex, mientras que las SASP, iones Ca^{2+} y ácido dipicolínico se acumulan en el protoplasto. En la etapa V se forma una estructura proteica alrededor de la forespora conocida como capa de la espora, adicionalmente en algunas las especies se forma una envoltura extra llamada exosporium. En este estadio la forespora pasa a denominarse endoespora temprana. Durante la fase VI ocurre la

maduración de la capa de la espota, la endoespora temprana adquiere resistencia térmica y a la luz ultravioleta y se llama endoespora madura. Asimismo, el cromosoma de la célula madre se degrada. Finalmente durante la etapa VII sucede la lisis de la célula madre y la liberación de la espota (Abel-Santos, 2015; Talukdar et al., 2014; Hobot, 2015; Al-Hinai et al., 2015).

La germinación es un proceso irreversible desencadenado en presencia de una mezcla de factores químicos principalmente nutrientes germinantes y/o factores ambientales que indican a la bacteria que las condiciones son propicias para el desarrollo celular, debido a lo cual la forma vegetativa de la bacteria emerge de la espota. La germinación no es completamente eficiente puesto que dentro de una misma población la tasa de germinación en respuesta a un determinado nutriente es heterogénea (Bassi et al., 2009; Drouin y Lafrenière, 2012; Xiao et al., 2015; Egan et al., 2016).

Los receptores Ger activan el proceso de germinación luego de reconocer nutrientes germinantes tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleósidos o compuestos quelantes cuando alcanzan niveles adecuados. En ciertas especies que carecen de receptores Ger como *C. difficile* y *C. perfringens*, la activación es mediada por otros tipos de receptores (Xiao, 2014; Egan et al., 2016). El reconocimiento desencadena la liberación de los iones Ca^{2+} y el ácido dipicolínico del núcleo de la espota y la hidratación parcial del mismo. A continuación enzimas hidrolíticas degradan la cubierta de la espota y el peptidoglicano del córtex permitiendo que el núcleo se hidrate más y se expanda, debido a esto la espota pierda su resistencia. Luego la pared celular germinal se separa del córtex y aumenta de espesor a medida que se sintetiza la nueva pared celular. Finalmente ocurre la ruptura de la cubierta y del córtex que permite la emergencia de la célula vegetativa. Dichas etapas se resumen en la Figura 7 (Brunt et al., 2014; Hobot, 2015; Xiao et al., 2015; Francis y Sorg, 2016).



Figura 7: Etapas del proceso de germinación de las esporas bacterianas. Adaptado de Brunt et al. (2014).

1.7 Métodos de control del desarrollo de *Clostridium* spp.

Diferentes métodos se han empleado para controlar el desarrollo de *Clostridium* spp. tales como la microfiltración de la leche que elimina el 99% de las esporas presentes pero requiere la separación de la grasa de la leche ya que el glóbulo graso es demasiado grande para pasar a través de la membrana de microfiltración y es un proceso costoso. Otro método es la bactofugación que logra remover el 95% de la carga bacteriana total y 98,7% de las esporas de bacterias anaerobias, puede no ser suficiente para evitar el desarrollo de este defecto, especialmente si la carga de esporas es muy alta. Además de acuerdo a Su e Ingham (2000) las esporas de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* y *C.*

beijerinckii son más difíciles de remover que las de *C. butyricum*. Asimismo es un método que consume tiempo, es laborioso y existe pérdida de componentes de la leche, principalmente proteínas (Garde et al., 2011b; Ávila et al., 2014; Brändle et al., 2016). El agregado de nitratos y lisozima es otra estrategia empleada que si bien está altamente regulada es percibido negativamente por los consumidores que demandan productos libres o con menor contenido de aditivos químicos (Garde et al., 2011b; Burke et al. 2013).

En el caso de los nitratos el mecanismo de acción comprende la reducción de éstos a nitritos por bacterias nitrato-reductoras presentes en la leche y la enzima xantina oxidasa (EC 1.2.3.2) que se encuentra asociada a la membrana del glóbulo graso, siendo los nitritos los que inhiben la germinación de las esporas. Si bien los nitratos son efectivos, su uso está prohibido en muchos países ya que pueden producir nitrosaminas carcinogénicas capaces de afectar la salud del consumidor (Beresford et al., 2001; Fox and Cogan, 2004; Garde et al., 2011b; Brändle et al., 2016). El uso de nitratos en la elaboración de quesos tipo Suizo inhibe a las bacterias ácido propiónicas y por lo tanto las características típicas que aportan a esta variedad de quesos (McSweeney, 2007).

La lisozima ampliamente empleada en la producción quesera (McSweeney, 2007; Bermúdez et al., 2016) actúa degradando la pared celular de las bacterias Gram-positivas (Proctor and Cunningham, 1988). Según Stadhouders y van den Berg (2012) es efectiva cuando la carga de esporas de bacterias ácido butíricas no excede las 300 esporas/L de leche. El uso de lisozima es permitido por el Codex Alimentarius pero la más utilizada comercialmente proviene de la clara de huevo, que está dentro de los ocho grupos de alimentos que causan el 90% de las alergias, además existen limitaciones para la efectividad de la lisozima, como la sensibilidad de los cultivos iniciadores, el alto recuento de esporulados y la resistencia de algunas esporas de *Clostridium* (Lodi, 1990; Brändle et al., 2016). El uso excesivo de lisozima puede promover la activación del proceso de germinación en *C. tyrobutyricum* (Bassi et al., 2009). Por todo esto, dicha forma de control es adecuada cuando la concentración de esporulados no es demasiado alta (Lodi, 1990).

Otro método utilizado es el descremado natural de la leche cruda, esta práctica es realizada en forma tradicional en la elaboración de quesos extra-duros italianos como el Parmigiano-Reggiano y Grana Padano para estandarizar el contenido de grasa logrando uniformidad en el “flavor” y la textura del producto. Se ha determinado que el descremado natural de la leche durante 8 a 10 h. a 8 °C permite remover más del 90% de las esporas, bacterias y células somáticas presentes en la leche, las cuales quedan adheridos a la superficie de los glóbulos butirosos de la grasa separada. La separación natural de la grasa de la leche se debe a sus crioglobulinas, que a temperaturas menores a 37 °C forman agregados que se depositan en la superficie de los glóbulos grasos, causando su aglutinación y el desnatado de la leche (D’Incecco et al., 2015, Fox et al., 2015). También se han empleado tratamientos térmicos severos como la ultra-alta temperatura (*Ultra-High Temperature* -UHT-) y la esterilización comercial que logran eliminar el 99,99% de las esporas presentes, sin embargo, estos tratamientos afectan el sabor y aroma de la leche (Doyle et al., 2015).

El uso de tinajas queseras de cobre también reduce la ocurrencia de hinchazón tardía respecto a las tinajas de acero inoxidable, porque éste tiene actividad anticlostridial. Sieber et al. (2006) así como Mato y Alatossava (2010) demostraron que el adición de sulfato de cobre a la leche empleada en la elaboración de queso Emmental a una concentración de 15ppm o superior es capaz de inhibir el crecimiento celular, la germinación de esporas y la esporulación de *C. tyrobutyricum*. Dicha concentración corresponde al contenido de cobre presente en este tipo de quesos cuando se emplean tinajas queseras de cobre. Sin

embargo debido a que el cobre puede tener actividad antimicrobiana sobre los cultivos iniciadores o adjuntos, así como afectar las actividades enzimáticas se requieren más estudios para determinar su impacto en la calidad de los quesos (Brändle et al., 2016).

Otro procedimiento preventivo aunque poco empleado, es la pre-maduración de los quesos y consiste en mantenerlos a temperaturas inferiores a 9 °C, usualmente a 7 °C, previo a su proceso de maduración. De acuerdo a Stadhouders (1990) estas condiciones son adversas para la germinación de las esporas y la proliferación vegetativa. La duración de esta etapa es variable porque también se busca favorecer la distribución homogénea de la sal en la masa del queso lo que depende de la relación superficie:volumen de éste. La pre-maduración tiene la desventaja de prolongar el tiempo de maduración requerido para lograr el “flavor” característico del producto y por lo tanto aumentar el gasto económico. Además pueden producirse alteraciones en las propiedades organolépticas cuando el tiempo de almacenamiento es excesivo o desarrollo anormal de la microflora de la superficie del queso debido a la condensación de agua por el cambio de temperatura al ser transferido a la cámara de maduración. A pesar de estos inconvenientes, este método a veces es empleado en la elaboración de quesos duros de tipo italiano como Grana Padano, Asiago y Montasio (Villar y Fernández, 1995; Spolaor y Marangon, 1997; Ledenbach y Marshall, 2009; Alvenäs, 2015; Klantschitsch, 2008; Brändle et al., 2016)

Una práctica similar a la anterior consiste en realizar la maduración del queso a una temperatura inferior para reducir el desarrollo de esporulados anaeróbios y la aparición de este defecto pero sin inhibir el desarrollo que las cepas NSLAB presentan en esta etapa. Los trabajos científicos existentes aún no son suficientes para definir dicha temperatura. Debido a esto, las plantas queseras deben determinar el rango de temperatura que les permiten inhibir las especies predominantes de *Clostridium* en los quesos elaborados sin afectar la maduración de los mismos (Alvenäs, 2015; Brändle et al., 2016).

En los quesos salados en salmuera un factor importante para reducir la ocurrencia de hinchazón tardía es el control de la concentración salina de la salmuera así como la temperatura de ésta. Asimismo existen procedimientos que buscan incrementar el contenido de sal en el queso aunque son escasamente empleados por el impacto que pueden tener en las características del producto final (Daly et al., 2010; Brändle et al., 2016).

En la elaboración del queso Provolone se emplea la hexametilentetramina (HMT) como compuesto anticlostridial. Bajo las condiciones ácidas del queso la HMT se descompone en amonio y formaldehído, siendo este último el responsable de inhibir el desarrollo de las esporas al reducir la disponibilidad de ciertas macromoléculas por asociación con ellas. Debido a la elevada reactividad del formaldehído con los ácidos nucleicos, la cantidad de HMT que puede añadirse a la leche no puede ser superior a 25 ppm y se debe verificar que el contenido de formaldehído al final de la maduración del queso sea menor a 0.5 ppm. El empleo de HMT como preservante alimentario sólo es permitido en la elaboración de queso Provolone en algunos países como Italia. La elevada toxicidad del formaldehído ha llevado a prohibir el uso de este compuesto así como de su precursor el HMT en la mayoría de los países.

Los polifosfatos son aditivos alimentarios que también pueden inhibir el desarrollo de *Clostridium* spp., los mismos son empleados en la manufactura de quesos procesados y quesos pasteurizados untables. Los polifosfatos actúan quelando iones Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} , además son capaces de formar canales en la membrana celular de las bacterias lo que aumenta la permeabilidad a compuestos inhibitorios, la fuga de metabolitos y la lisis

celular. Otras estrategias que han resultado efectivas son el uso de peróxido de hidrógeno, extractos de plantas aromáticas y el agregado de bacteriófagos de *C. tyrobutyricum* (Lücke y Jager, 1997; Jay et al., 2005; Aureli et al., 2011; Glass y Doyle, 2013; Brändle et al., 2016).

Las formas de control comúnmente empleadas por la industria quesera son la microfiltración, la bactofugación y el agregado de lisozima o nitratos. Una alternativa para mantener la seguridad y calidad alimentaria sin el uso de aditivos químicos es el empleo de cultivos de BAL con *status* GRAS (Generally Regarded As Safe) capaces de controlar microorganismos de deterioro y/o patógenos para el consumidor mediante la producción *in situ* de compuestos con efecto bacteriostático o bactericida y que son factibles de incorporarse en la producción quesera como cultivos iniciadores (bacterias ácido lácticas iniciadoras -LAB-) o adjuntos (bacterias ácido lácticas no iniciadoras -NSLAB-) cuyo espectro de acción no comprende especies de BAL de uso tecnológico. Una estrategia similar es la adición en el alimento de los compuestos antibacterianos (bacteriocinas) producidos *ex situ*. Actualmente la nisina es la única bacteriocina que se puede emplear como preservante alimentario a nivel mundial (Gálvez et al., 2008; Marcó et al., 2012; Fan y Song, 2013; Burke et al., 2013).

La concentración máxima permitida de nisina en quesos varía de acuerdo a la legislación de cada país, incluso en algunos países como Australia, Reino Unido y Francia no se ha establecido límite en la concentración de nisina permitida. Sin embargo el “Códex sobre Leche y Productos Lácteos” de la FAO/OMS (CXS 283-1978, 1999) establece que el uso de nisina como aditivo alimentario no puede exceder de 12.5 mg de nisina pura/ kg de alimento. A nivel de la producción quesera este valor equivale a 1.25 mg de nisina/L de leche puesto que 1 kg de queso se obtiene aproximadamente a partir de 10 L de leche (Ávila et al., 2014; Gharsallaouri et al., 2015; Müller-Auffermann et al., 2015; Alfaro y Chang, 2017). Dicha concentración es suficiente para evitar el crecimiento de las especies predominantes de *Clostridium* en el producto elaborado, porque la concentración mínima inhibitoria (MIC) de nisina que inhibe la proliferación de células vegetativas es de 0.10 a 6.25 µg/mL. La concentración recomendada no garantiza la ausencia de germinación de esporas clostridiales, ya que la MIC de nisina requerida para inhibir la germinación de esporas de dichas especies es alta, hasta 59 µg/mL (Martínez y Rodríguez, 2007; Hofstetter et al., 2013; Garde et al., 2014).

También se ha propuesto el empleo de cepas LAB o NSLAB capaces de consumir nutrientes que resultan esenciales para el desarrollo de *Clostridium* spp.. Los compuestos lactato y acetato son empleados como fuentes de carbono por *C. tyrobutyricum* pero se encuentran en alta concentración en quesos, por lo que es necesario considerar otros nutrientes como aminoácidos o las vitaminas del complejo B cuya disponibilidad sea limitante (Ivy y Wiedmann, 2014). Sin embargo, existe poca información respecto a los requerimientos de este grupo bacteriano. Storari et al. (2016) determinaron que la biotina (vitamina B7) es esencial para el crecimiento de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. También encontraron que el *p*-aminobenzoato (PABA) precursor del folato (vitamina B9) es requerido por *C. tyrobutyricum*, mientras que *C. sporogenes* además de folato y biotina, requiere cobalamina (vitamina B12) y varios aminoácidos. Además se ha demostrado que L-alanina y L-lactato son capaces de inducir la germinación y el crecimiento vegetativo.

1.8 Fuentes de contaminación y estrategias de control a nivel del tambo

Los métodos de control aplicables a nivel industrial se enfocan en evitar la germinación de las esporas presentes en la leche e inhibir el crecimiento de las células vegetativas. Las limitaciones que estos procedimientos presentan hacen necesario complementarlos con estrategias orientadas a reducir la contaminación de la leche cruda con esporas a nivel del tambo. Estas consisten en la implementación de las correctas prácticas de manejo e identificación de las fuentes de contaminación implicadas en cada caso para establecer medidas preventivas específicas capaces de disminuir la transmisión de esporulados al tanque de frío (Martin, 2014; Szabolcs, 2014; Murphy et al., 2016).

En el ambiente del tambo existen varias fuentes de contaminación de la leche con esporas de *Clostridium* spp. (Fig. 8) estas son el suelo, el alimento suministrado a los animales, las heces, el aire, el equipo de ordeño y las camas cuando el sistema de cría es por estabulación (Carrosio, 2014). Aunque el suelo es el habitat primario de las esporas clostridiales y la carga presente es un factor sobre el cual no se tiene control, el tipo de alimento aportado es una de las fuentes más importantes de contaminación, en las pasturas la carga de esporas anaeróbicas usualmente es 10^3 esporas/g (Visser, 2007).

Los ensilados que son una de las formas más empleadas para conservar los forrajes constituyen la principal vía de transmisión de esporulados anaeróbicos a la leche cruda, sobre todo cuando son de mala calidad. Visser et al. (2006; 2007) recomiendan como estrategia principal para asegurar una baja concentración de esporas en el tanque de frío, menos de $1,3 \times 10^3$ esporas/L de leche, aportar ensilados de buena calidad con menos de 10^4 esporas/g o por lo menos que no excedan de 10^5 esporas/g carga asociada a silos de mala calidad porque aunque se apliquen los mejores procedimientos higiénicos a los pezones no se puede evitar la transmisión de las esporas a la leche. En el caso de la preservación por henolaje, cuando se logra la buena calidad generalmente no permite la germinación de las esporas ni el desarrollo de las células vegetativas porque se consigue reducir la humedad natural por debajo del 15%, presentando recuentos similares a los de las pasturas frescas (Klantschitsch, 2008; Drouin y Lafrenière, 2012; Driehuis, 2013; Hafner et al., 2013; Turchi et al., 2016).

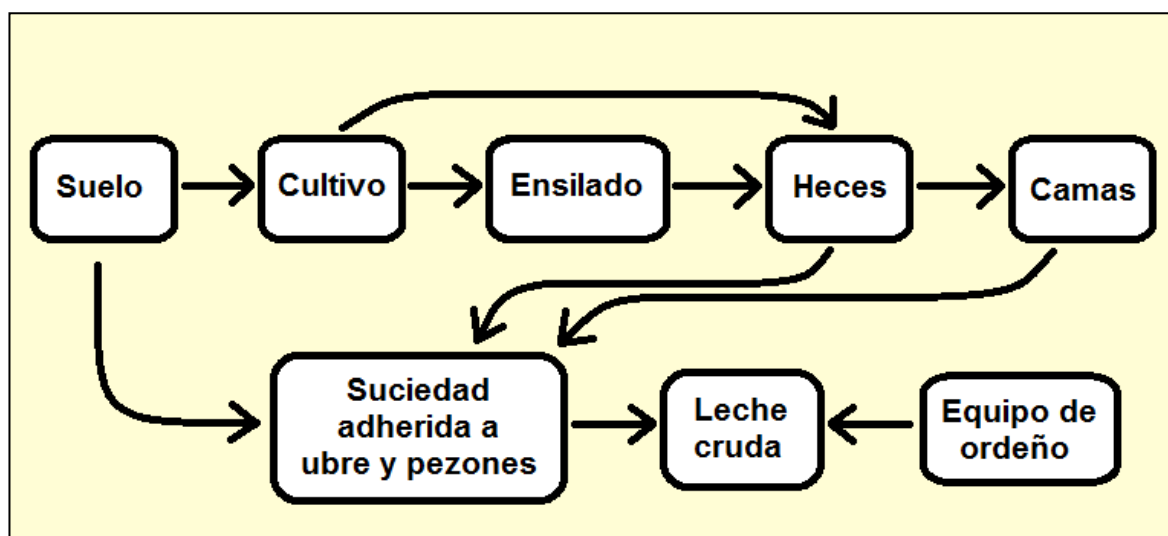


Figura 8: Vías de contaminación de la leche cruda con esporas de *Clostridium* spp. Adaptado de Visser (2007).

El ensilaje al igual que otras formas de conservación de forrajes intenta preservar el máximo valor nutricional que éstos presentan al ser colectados en los períodos de abundancia, para aportarlos en las épocas de escasez o cuando se requiere suplementar la alimentación debido a la intensificación de la producción ganadera. En el ensilaje los forrajes son sometidos a condiciones anaeróbicas para que se desarrolle una fermentación ácido láctica, obteniéndose un producto con bajo pH, entre 3.8 y 4.2, que no permite el desarrollo de microorganismos patógenos ni de deterioro de sus componentes nutricionales (Hafner et al., 2013; Schroeder, 2013). Si la acidificación generada es insuficiente o se produce de forma muy lenta pueden crecer microorganismos de deterioro principalmente *Clostridium* spp., enterobacterias, *Bacillus* spp., hongos y levaduras (Vissers y Driehuis, 2009).

El desarrollo de *Clostridium* spp. ocurre en silos húmedos con menos de 30% de materia seca y alta capacidad amortiguadora cuando la acidificación generada es insuficiente o se produce de forma muy lenta provocando el deterioro anaeróbico del silo. Bajo estas condiciones *C. tyrobutyricum* fermenta los ácidos láctico y acético producidos por las bacterias ácido lácticas, mientras que las especies sacarolíticas, como *C. butyricum* fermentan los carbohidratos remanentes de la planta. El ácido butírico producido en la fermentación conduce al aumento del pH. Esto permite el crecimiento de las especies proteolíticas, como *C. sporogenes* y *C. bifermentans*, que son menos ácido-tolerantes. Las mismas degradan proteínas y aminoácidos lo que reduce el contenido de nitrógeno disponible. Como resultado del deterioro anaeróbico disminuye la calidad nutricional, el grado de conservación del forraje y la palatabilidad del mismo (Piltz y Kaiser, 2004; Khanal, 2009; Driehuis, 2013; Zucali et al., 2014).

Por otra parte, el deterioro aerobio del silo también puede facilitar el desarrollo de *Clostridium* spp. de la forma que se describe a continuación. Esta alteración ocurre cuando la compactación del forraje es inadecuada o al exponer el silo al aire en la etapa de apertura donde el oxígeno penetra profundamente. En ambas condiciones existe mayor concentración de oxígeno lo que permite el crecimiento de microorganismos aeróbicos acidúricos como hongos, levaduras y enterobacterias que consumen el oxígeno y los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL, por ejemplo los ácidos orgánicos. De esta manera se crean micro-nichos con menor actividad inhibitoria que son más factible para el crecimiento de *Clostridium* spp. (Zucali et al., 2014; Persson, 2015).

Arias et al. (2013) determinaron que la leche de oveja obtenida de animales alimentados con ensilados presentó en promedio dos veces y media más esporulados anaerobios. De acuerdo a Driehuis (2013) de las especies de bacterias ácido butíricas aisladas de silos, *C. tyrobutyricum* es la principal responsable de la fermentación ácido butírica por su capacidad de soportar bajo pH y catabolizar ácido láctico. Las esporas existentes en los ensilados además de poder contaminar la leche mediante el contacto con la ubre en el ordeño, son capaces de acceder a ella mediante las deyecciones del animal alimentado, porque una vez ingeridas soportan el tracto digestivo y se concentran respecto al volumen total ingerido, resultando en niveles tres a diez veces mayores a los presentados en los silos, en consecuencia las heces constituyen una vía de dispersión de gran importancia en el tambo (Klantschitsch, 2008; Driehuis et al., 2016; Drouin y Lafrèniere, 2012).

Independientemente de la procedencia de las esporas la principal forma por la que logran contaminar la leche cruda ocurre al encontrarse en la piel de los pezones y establecer contacto con las pezoneras de la máquina de ordeño. Debido a esto practicar una correcta rutina de limpieza de los pezones previa al ordeño logra reducir la carga de esporas en éstos y el riesgo de contaminación de la leche cruda. Cuando el método de

limpieza se realiza en forma inadecuada un mayor número de células vegetativas y esporas permanece en la superficie del pezón siendo capaces de pasar a la leche durante el proceso de ordeño (Driehuis, 2013). Se debe lavar únicamente los pezones en lugar de toda la ubre porque pueden arrastrarse microorganismos patógenos como *Streptococcus uberis* o *Escherichia coli* al pezón promoviendo su infección durante el ordeño. Además los pelos de la ubre sobre todo cuando son largos, son más difíciles de lavar y secar, debido a esto algunos investigadores recomiendan la eliminación de éstos para reducir la adherencia de suciedad, heces y materiales de la cama a ésta y evitar la contaminación de la leche (Hovinen et al., 2005; Pinagorte, 2009).

Magnusson et al. (2006) evaluaron el efecto de diferentes procedimientos de limpieza de los pezones sobre la carga de esporas en la leche. En este trabajo el empleo de toallas húmedas permitió eliminar entre 50 al 70% del contenido de esporas, realizando el mismo procedimiento por más tiempo, usando dos toallas humedecidas o aplicando jabón lograron una reducción entre 85 al 91%. Incluso se pudo eliminar el 96% de las esporas por un doble tratamiento cada uno por 10 segundos con toallas humedecidas, ó mediante el uso de toallas humedecidas con o sin jabón durante 10 segundos y posterior secado con papel toalla por igual duración de tiempo. Asimismo el presellado del pezón también denominado “pre-dipping” es un procedimiento opcional que junto con el sellado del pezón post-ordeño o “dipping” y acoplados con el secado de los pezones con toallas individuales permiten reducir la contaminación con microorganismos termodúricos como *Clostridium* spp., aunque es recomendable que la solución desinfectante empleada en el “pre-dipping” se encuentre a una concentración menor a la aplicada en el dipping (Doyle et al., 2015)

Durante la rutina de ordeño también pueden cometerse procedimientos erróneos que facilitan el acceso de esporulados anaerobios al tanque de frío, por ejemplo el contacto de las pezoneras con el piso, omitir el lavado de las mismas cuando esto ocurre, deslizamiento de las unidades o retiro de éstas sin cortar previamente el vacío generando en ambos casos entrada de aire y reflujo de leche (Vissers y Driehuis, 2009; Arias, 2013). El equipo de ordeño también puede ser fuente de contaminación si no se realiza una adecuada rutina de limpieza y mantenimiento, en este punto es importante señalar que las pezoneras deben estar en buen estado, cuando el caucho de éstas se desgasta la grasa de la leche se deposita en las superficies rugosas y actúa como foco de contaminación. La contaminación de la maquinaria de ordeño también es favorecida por un mal diseño de sus componentes o un incorrecto montaje de ellos, así como por la presencia de “biofilms” (Pinargote, 2009; Arias et al., 2013, Gleeson et al., 2013).

Las diversas fuentes de contaminación de la leche hacen necesario complementar la rutina de ordeño con una serie de correctas prácticas en el manejo del ganado y el mantenimiento de la higiene del tambo. En este sentido la limpieza de la sala de ordeño y la ausencia de polvo resultan esenciales, Corrot (1989) determinó en leche bovina que el 33% de las esporas butíricas provenían del aire circundante. De acuerdo al estudio realizado por Arias et al. (2013) en leche ovina la ocurrencia de recuentos de esporas clostridiales superiores a 10^3 esporas/ml fue 2.54 veces mayor en presencia de polvo en la sala de ordeño y 2.51 veces más alta en salas de ordeño higienizadas inadecuadamente. Otra práctica importante durante el proceso de ordeño es el lavado regular de la unidad de ordeño, así como de la plataforma en la cual las vacas son ubicadas, en los momentos en que no se encuentran presentes. También deben lavarse los accesos y la sala de espera luego de cada ordeño para evitar la acumulación de barro y excremento (Pinargote, 2009; Gleeson et al., 2013; Carrosio, 2014). Una vez culminado el ordeño de todo el rebaño se debe remover la suciedad y las heces de la sala de ordeño y proceder a limpiarla, respecto a este punto la selección de los agentes químicos

empleados en la desinfección de la maquinaria de ordeño y la concentración de éstos resulta esencial para reducir el riesgo de contaminación de la leche cruda con bacterias termodúricas (Doyle et al., 2015).

Por otra parte, es aconsejable evitar los cambios en la alimentación suministrada a los animales porque conducen a la generación de heces blandas favoreciendo la contaminación de la ubre y exigiendo mayor intensidad en la rutina de limpieza del pezón (Carrosio, 2014). La ubicación y las condiciones de higiene de los comederos también son importantes, lo más adecuado es que éstos se encuentren alejados del suelo, con baja presencia de barro, heces y sin restos de suministros anteriores (Nescier et al. 2015).

En los sistemas ganaderos intensivos o semi-extensivos, como los existentes en Estados Unidos y varios países europeos, los animales son alimentados con ensilajes y mantenidos estabulados. Debido a esto hay que controlar la limpieza, calidad y ausencia de humedad del material de la cama, así como renovarlo con regularidad y remover periódicamente las heces del establo. En estos sistemas productivos la contaminación de la leche con esporulados anaerobios ocurre principalmente a partir de los pezones sucios con excretas o material de las camas (Visser y Driehuis, 2009; Arias et al., 2013; Hafner et al., 2013; Carrosio, 2014).

En Uruguay, Argentina, Brasil, Australia, Nueva Zelanda, Irlanda y algunas regiones occidentales de Reino Unido el ganado se cría por pastoreo por lo que no es estabulado. En estos sistemas productivos denominados pastoriles o extensivos la principal vía de contaminación de la leche con esporas clostridiales es por contacto de la ubre con el suelo o la pastura cuando los animales se echan y mediante el aire que actúa como vía de transmisión (Comeron, 2007; Phillips, 2009, Angón et al., 2013). El aporte de ensilados en Uruguay ha estado tradicionalmente asociado a las épocas de bajo rendimiento forrajero, sin embargo la intensificación de la producción ganadera ha llevado a un aumento en el uso de este complemento, lo que promueve la contaminación de la leche cruda con esporas de bacterias ácido butíricas (Colombari et al., 2001; Chilibraste, 2015; Nescier et al., 2015). En Suiza y ciertas regiones de Alemania y Francia las regulaciones actuales prohíben el uso de leche cruda proveniente de animales alimentados con ensilados para la elaboración de quesos de pasta dura y semidura con el fin de reducir el aporte de esporas (Daly et al., 2010; Ivy y Wiedmann, 2014).

La carga de esporulados anaeróbicos en los silos también presenta diferencias según el tipo de forraje fermentado y la calidad de los mismos. Generalmente se detectan mayores recuentos de esporulados en los ensilados de pasto y alfalfa, por la elevada contaminación con tierra y heces, por ende con las esporas presentes al ser cortados, a diferencia de los hechos con maíz o sorgo que son plantas más altas. La gran capacidad amortiguadora de los cultivos de pasto y alfalfa es otra característica que también dificulta el proceso de acidificación. En maíz y sorgo el elevado contenido de materia seca, baja capacidad buffer y adecuada disponibilidad de carbohidratos fermentables favorecen la obtención de ensilados de buena calidad, razón por la que son los más empleados (Zucali et al., 2014; Driehuis et al., 2016). Otro aspecto a mencionar es que los ensilajes de pasturas suelen presentar mayores recuentos de esporas cuando el suelo se fertiliza con estiércol en vez de fertilizantes químicos. (Hafner et al., 2013; Ivy y Wiedmann, 2014; Doyle et al., 2015).

Los silos luego de abiertos requieren un correcto manejo y conservación para evitar la proliferación de *Clostridium* spp.. Algunas prácticas recomendadas en este sentido consisten en controlar la ausencia de roturas en la bolsa del silo, también algunos

investigadores aconsejan no cubrir la cara expuesta del silo porque el aire acumulado entre la materia vegetal y la cubierta plástica genera un aumento de la humedad que favorece el crecimiento de hongos y levaduras que provocan el deterioro aeróbico del silo (Seguí, 2009; Nescier et al., 2015; Gupta y Brightwell, 2017).

Una medida para limitar la contaminación de la leche cruda con esporas clostridiales a partir del ensilado es controlar los parámetros asociados a la calidad del proceso de ensilaje, entre ellos el contenido de esporas clostridiales. Aunque es más confiable emplear como indicador de la calidad del ensilado la cuantificación de esporulados anaeróbios en las deyecciones a las 72 horas de ser consumido el alimento (Nescier et al., 2015). Asimismo es posible mejorar la calidad del ensilado agregando ácido propiónico, fórmico u otro aditivo o empleando como inoculantes cepas de bacterias ácido lácticas que aseguren la rápida acidificación del ensilaje o produzcan otros metabolitos con acción anticlostridial (Neureiter et al., 2005).

Además de las estrategias mencionadas, muchos investigadores han planteado la necesidad de incluir el recuento de esporas butíricas en los sistemas de pago por calidad de la leche para estimar el riesgo de hinchazón tardía. Actualmente en la mayoría de los países, incluyendo Uruguay, el pago por calidad de la leche sólo considera el recuento de microorganismos mesófilos totales como indicador de su calidad microbiológica, este parámetro no es útil para prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía (Arias, 2013; Arias et al., 2013; Jiménez et al., 2013). Sin embargo, en regiones de Francia, Italia, Holanda, Suecia, Noruega, Suiza, Dinamarca, Finlandia y España, que son importantes a nivel mundial por su producción quesera, este parámetro ha sido implementado en sus sistemas de pago. Asimismo, en algunos de estos países las empresas lácteas son las que fijan el precio de la leche y pueden exigir parámetros adicionales a los recuentos de mesófilos totales y células somáticas para determinar la calidad de ésta, por ejemplo el recuento de esporulados anaeróbios (Arias, 2013; Valladares, 2016; Mucchetti y Zambrini, 2017).

1.9 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos Gram-positivos pertenecientes al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. Se caracterizan por ser microaerófilos o anaeróbios facultativos, con morfología cocoide o bacilar típicamente no móviles, no esporulados, que carecen de las enzimas catalasa y citocromo oxidasa. Producen ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de carbohidratos y tienen un contenido inferior al 50 mol% de guanina y citosina (G+C %) en su genoma. Pueden ser mesófilos o termófilos, con una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C o 42 °C, respectivamente. El rango de pH óptimo para el crecimiento es de 4.0 a 4.5 (da Silva et al., 2014; Jiménez, 2015).

Se encuentran en habitats con baja tensión de oxígeno y ricos en carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas y vitaminas ya que requieren la presencia de ciertos aminoácidos, péptidos, bases nitrogenadas, ácido fólico, biotina, vitaminas y ácido pantoténico como factores de crecimientos, dichos habitats son: leche y productos lácteos, frutas y hortalizas frescas, productos cárnicos y vegetales fermentados, ensilados, el tracto gastrointestinal y otras mucosas del hombre y los animales (Jiménez, 2015).

Este grupo bacteriano corresponde al orden Lactobacillales que está constituido por seis familias: *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Enterococcaceae*. Los géneros que componen este orden taxonómico han sido revisados en forma reiterada y muchos de ellos fueron incorporados recientemente. Se considera que *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* constituyen el grupo central. Por otra parte *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Vagococcus* son ampliamente considerados géneros de BAL. Los restantes miembros actualmente comprendidos en este orden son *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopostipes*, *Bavariicoccus*, *Atopococcus*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*, *Lactosphaera*, *Paralactobacillus*, *Lactovum*, *Fructobacillus*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pisiglobus* y *Pilibacter* (Khalid, 2011; Vandamme, De Bruyne y Pot, 2014; Felis et al., 2016)

Los géneros de BAL comúnmente asociados a alimentos son *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Doyle et al., 2013; da Silva et al., 2014). Específicamente en leche y productos lácteos fermentados se encuentran cepas de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* (Quigley et al., 2013).

Los miembros de este grupo bacteriano pueden realizar fermentación homoláctica o heteroláctica por lo que se diferencian en bacterias homofermentadoras y heterofermentadores, respectivamente. Las dos formas de fermentación difieren en la cantidad de ácido láctico producido, además en la fermentación heteroláctica se producen otros metabolitos finales (Fig. 9), que impactan en las características del producto fermentado. Las bacterias homofermentativas estrictas fermentan hexosas por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y generan 85% de ácido láctico. Estos microorganismos no pueden catabolizar pentosas al carecer de la enzima fosfocetolasa responsable de la ruptura de la xilulosa-5-fosfato producida en la degradación de las pentosas. Con respecto a las bacterias heterofermentativas pueden ser estrictas o facultativas, las estrictas sólo pueden fermentar pentosas mediante la vía de la pentosa fosfato originando 50% de ácido láctico junto con CO₂ y etanol o acetato que aportan otras propiedades al producto. La incapacidad de éstas para fermentar hexosas se debe a la ausencia de la enzima aldolasa necesaria para la conversión de la fructosa-1,6-difosfato generada en el catabolismo de hexosas en gliceraldehído-3-fosfato. Por otra parte existen BAL heterofermentativas facultativas que son capaces de utilizar hexosas y pentosas porque expresan la enzima aldolasa en forma constitutiva pero además inducen la fosfocetolasa en presencia de azúcares de 5C (Fugelsang y Edwards, 2007; Reginensi et al., 2016).

Fermentación homoláctica:



Fermentación heteroláctica:



Figura 9: Balances químicos de las fermentaciones homoláctica y heteroláctica (Adaptado de Fugelsan y Edwards, 2007).

Las BAL suelen tener *status* GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, son reconocidas como generalmente seguras para el ser humano, debido a que han sido utilizadas a lo largo de la historia para la elaboración de alimentos fermentados sin causar problemas de salud en el consumidor. En consecuencia tienen grado alimentario y son empleadas a nivel artesanal e industrial. Sin embargo el *status* GRAS debe ser conferido a cada aislamiento evaluado porque existen cepas BAL portadoras de genes de resistencia a antibióticos o que codifican factores de virulencia, por lo que pueden constituir un riesgo sanitario. Además puede ocurrir transferencia de estos determinantes genéticos a otras bacterias patógenas o potencialmente patógenas. Es importante indicar que pueden existir cepas resistentes a antibióticos cuya resistencia es intrínseca y no transmisible (Settanni et al., 2011; Leboš et al., 2013; Egan et al., 2016).

En base a lo explicado, la selección y caracterización de cualquier cepa debe incluir estudios de inocuidad y de resistencia a antibióticos, así como detección de genes asociados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos. La presencia de genes de resistencia a antibióticos no es una característica generalmente aceptada en cepas que se desean emplear como cultivos iniciadores o probióticos, aunque algunos investigadores señalan que el uso de cepas probióticas con resistencia intrínseca a antibióticos puede ser beneficioso en personas sometidas a antibiototerapia cuya microflora intestinal se ha desbalanceado o reducido (Leboš et al., 2013).

1.9.1 Cultivos iniciadores

Para la generación de alimentos fermentados la industria alimentaria emplea cepas LAB y NSLAB seleccionadas por las características tecnológicas conferidas, estabilidad de las mismas y capacidad de competir con la microbiota existente en el alimento, dichas cepas se denominan cultivos iniciadores. Una de las razones para su uso es que al acidificar el alimento y generar compuestos antimicrobianos impiden el desarrollo de microorganismos de deterioro y patógenos favoreciendo la preservación y seguridad microbiológica de los productos fermentados. También son utilizadas por las características de sabor, aroma y textura que aportan mediante los procesos de glucólisis, proteólisis y lipólisis que llevan a cabo (Herreros, 2010; Todorov et al., 2012). Existen variados productos alimentarios elaborados mediante fermentación por bacterias ácido lácticas, tales como quesos, yogur y otras leches fermentadas, en la producción de salame y otros embutidos, vegetales fermentados por ejemplo chucrut, kimchi y aceitunas, en vinos y productos de panadería elaborados con masa madre (du Toit et al., 2010; Florou-Paneri et al., 2013).

A nivel de la industria láctea se emplean como cultivos iniciadores principalmente cepas o mezclas de cepas de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Halász, 2009; Szczepankowska et al., 2013). El desarrollo del queso y otros productos lácteos fermentados a partir de leche cruda sin agregado de cultivos microbianos se debe al desarrollo de las bacterias ácido lácticas nativas de la leche y provenientes de los equipos de procesamiento y del ambiente de producción. A pesar que estos microorganismos aportan características propias al producto, las posibles variaciones en la composición de la microflora presente pueden conducir a diferencias en las características finales, sobre las cuales muchas veces no se tiene control. El uso de cultivos iniciadores capaces de competir con los microorganismos de la leche y eventualmente prevalecer sobre éstos, es una forma en que se logra direccionar los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la elaboración del producto (Settanni et al., 2013).

1.9.2 Clasificación de cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores se distinguen en iniciadores primarios o cultivos primarios e iniciadores secundarios o cultivos adjuntos. Las cepas iniciadoras primarias o bacterias ácido lácticas iniciadoras (LAB) son adicionadas para la generación de acidez y disminución del pH, ya que catabolizan los carbohidratos por fermentación homoláctica, generando ácido láctico como producto principal. Desde el punto de vista tecnológico Beresford et al. (2001) definieron que los iniciadores primarios son cepas capaces de producir ácido láctico suficiente para provocar el descenso del pH de la leche por debajo de 5,3 a las 6 horas de crecimiento a temperatura entre 30 y 37 °C (Todorov y Franco, 2010; Bachmann et al., 2011; Dias, 2011).

La acidificación producida por las cepas LAB además de otorgar seguridad microbiológica al producto, interviene en el cambio de las propiedades reológicas que sufre la leche durante su procesamiento al desestabilizar las micelas de caseínas y favorecer su precipitación formando la cuajada del queso o el coágulo del yogur. En la producción quesera, las cepas LAB también son importantes por contener peptidasas, lipasas, esterases y enzimas del catabolismo de aminoácidos que son liberadas en la matriz del queso cuando las células sufren autólisis debido a que las condiciones fisicoquímicas del queso se vuelven hostiles para su desarrollo (ver ítem 1.11.3 - Desarrollo y contribución de las NSLAB en quesos). Estas enzimas conservan su actividad biológica durante la maduración del queso y originan compuestos de aroma y sabor. Las peptidasas degradan los péptidos resultantes de la proteólisis generando aminoácidos libres cuyo catabolismo origina componentes aromáticos volátiles. Las lipasas y esterases hidrolizan triglicéridos produciendo ácidos grasos que son convertidos posteriormente en compuestos aromáticos (Parra, 2010; Santarelli, 2012).

En quesos tipo Suizo se suelen emplear como *starters* primarios *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, sin embargo existen variedades donde *Lactobacillus helveticus* se utiliza en lugar de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que en algunos quesos de consistencia semidura se incluyen cepas mesófilas como parte del *starter* primario, por ejemplo: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *L. lactis* subsp. *cremoris*. Los cultivos iniciadores primarios utilizados en la elaboración de quesos Holandeses son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Mientras que para quesos italianos como Mozzarella, Grana Padano y Parmigiano Reggiano se utilizan cultivos termófilos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o *L. helveticus* o *Lactobacillus fermentum* (Szczepankowska et al., 2013; Maciel, 2008; Johnson y Law, 2010; Bachmann et al., 2011; Santarelli, 2012; Chandan, 2014; Farkye, 2014).

Los cultivos iniciadores secundarios o adjuntos son microorganismos que forman parte de la microflora autóctona de la leche cruda o provienen del ambiente del tambo y de la línea de producción, esta microbiota denominada secundaria está integrada principalmente por bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB), mohos, levaduras y bacterias ácido propiónicas que son predominantes durante la etapa de maduración de los quesos. A diferencia de las LAB, estos microorganismos contribuyen en forma limitada o nula al desarrollo de la acidez, porque generalmente degradan los azúcares por fermentación heteroláctica. Sin embargo existen cepas de interés para la industria quesera por las características de aroma, sabor o mejoramiento de la textura que confieren al producto durante la etapa de maduración de los quesos (Halász, 2009; Todorov y Franco, 2010; Kołakowski et al., 2012). Cabe aclarar que el concepto de cultivo adjunto es

utilizado por varios autores en referencia a las cepas adicionadas a la leche con cualquier finalidad diferente al desarrollo de acidez, por ejemplo para mejorar otras características sensoriales, ejercer actividad bioprotectora contra microorganismos alterantes y/o patógenos o porque poseen efecto probiótico (Alegría, 2013). En la Tabla 4 se resumen las principales especies y subespecies de LAB y NSLAB presentes en quesos (Parra, 2010; Alvenäs, 2015; Reginensi et al., 2016).

Tabla 4: Principales especies y subespecies de LAB y NSLAB presentes en quesos (Alvenas, 2015).

LAB	NSLAB
Lactococcus :	Lactobacillus heterofermentativos facultativos:
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. paracasei</i>
Streptococcus :	<i>L. rhamnosus</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>L. plantarum</i>
Lactobacillus homofermentativos:	<i>L. curvatus</i>
<i>L. helveticus</i>	Lactobacillus heterofermentivos estrictos:
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. parabuchneri</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. reuteri</i>
	Pediococcus :
	<i>P. pentosaceus</i>
	<i>P. acidilactici</i>
	Enterococcus :
	<i>E. faecium</i>
	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. durans</i>
	Leuconostoc :
	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
	<i>L. paramesenteroides</i>
	<i>L. lactis</i>

En las industrias y queserías artesanales que pasteurizan la leche se eliminan los microorganismos patógenos presentes y parte de la microflora de deterioro, pero también microorganismos de la microbiota secundaria que resultan tecnológicamente beneficiosos. Debido a esto, en la elaboración de quesos cuyas características organolépticas dependen en gran medida de la microbiota secundaria, principalmente los que tienen largos tiempos de maduración, se adicionan a la leche cepas de relevancia tecnológica como cultivos adjuntos junto con el *starter* primario para obtener características similares a las de los productos artesanales se utilizan cepas de relevancia tecnológica aislados de ésta (Alegría, 2013; Cárdenas, 2015; Nami et al., 2015; Egan et al., 2016).

El aporte de “flavor” (aroma y sabor) conferido por estas cepas se debe a la producción de compuestos aromáticos volátiles a partir de piruvato que son: acetato, diacetilo, acetaldehído y etanol. El etanol contribuye al sabor característico de las leches fermentadas tales como el kefir y el koumiss, mientras que la producción de diacetilo es importante en la manteca, los quesos Cottage, Camembert, de tipo Suizo y Holandés y en

la ricota. Por otra parte el acetaldehído es el principal compuesto aromático en el yogur. La contribución a la textura se debe a la producción de exopolisacáridos que pueden ser secretados como mucílago o encontrarse sobre la superficie celular formando una cápsula por lo que se denominan exopolisacáridos capsulares. Éstos aumentan la viscosidad y firmeza del producto, mejoran la sensación en la boca del yogur y quesos bajos en grasa, también en el yogur reducen el riesgo de sinéresis (Hati et al., 2013; Clark y Winter, 2015).

Los principales cultivos adjuntos empleados por la industria quesera son: bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB), cepas de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, hongos como *Penicillium camemberti* que desarrolla proteólisis en la superficies de quesos como Brie y Camembert o *Penicillium roqueforti* para la generación de lipólisis, sabor, aroma, color y proteólisis en quesos veteados azules, ejemplo Stilton, Gorgonzola y Roquefort. En quesos de pasta lavada como Tilsit, Münster y Limburger se emplea la especie *Brevibacterium linens* para aportar color por la producción de carotenoides, así como aroma y sabor por su actividad proteolítica y lipolítica. Esta bacteria crece en la superficie del queso en sinergismo con levaduras como *Geotricum*, *Kluyveromyces*, *Mycoderma* o *Debaryomyces*, que también sintetizan pigmentos que afectan a la coloración de la corteza (McSweeney, 2007; Platero, 2008; Santarelli, 2012; Alegría, 2013; Forquin y Weimer, 2013).

Los cultivos iniciadores también pueden ser diferenciados de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento en mesófilos y termófilos. Los cultivos mesófilos disponibles comercialmente tienen una temperatura óptima de 30 °C aproximadamente y comúnmente consisten en cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* y/o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Se los utiliza para elaborar gran variedad de quesos y leches fermentadas. Los cultivos termófilos son mayoritariamente empleados para la producción de yogur, así como de quesos semiduros y duros italianos y suizos, la temperatura óptima es 42 - 45 °C y generalmente están constituidos por cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y/o *Lactobacillus helveticus*. Además los cultivos iniciadores pueden distinguirse en definidos y no definidos. Los cultivos definidos están compuestos por una o más cepas que están identificadas y caracterizadas tecnológicamente (de Fatima y Pintado, 2010; Santarelli, 2012; Alegría, 2013; Fox, 2017).

Con respecto a los cultivos no definidos consisten en una porción del suero lácteo o de la crema proveniente de un proceso de fermentación previo que es inoculada en la leche de un nuevo proceso aprovechando la mezcla de cepas de BAL presentes en dicha materia prima como microorganismos iniciadores. Esta práctica, aunque tiende a favorecer la fermentación natural de la leche y la composición óptima de la comunidad microbiana, obteniéndose productos con características de aroma, sabor y textura distintivas, también puede conducir a productos defectuosos al desconocerse la composición y la carga bacteriana de la materia prima inoculada (Sgarbi, 2012; Smid et al., 2014; Fox, 2017).

El uso de cultivos no definidos a nivel artesanal es una práctica frecuente, sobretudo en la manufactura de quesos tradicionalmente elaborados con leche cruda como son Parmigiano Reggiano, Emmental, Grana Padano y Comté. Para la producción de estas variedades de quesos se emplea suero lácteo incubado bajo las condiciones que son óptimas para el crecimiento del cultivo denominado Cultivo Natural de Suero (*Natural Whey Culture* -NWC-) (Santarelli, 2012; Smid et al., 2014; Fox, 2017).

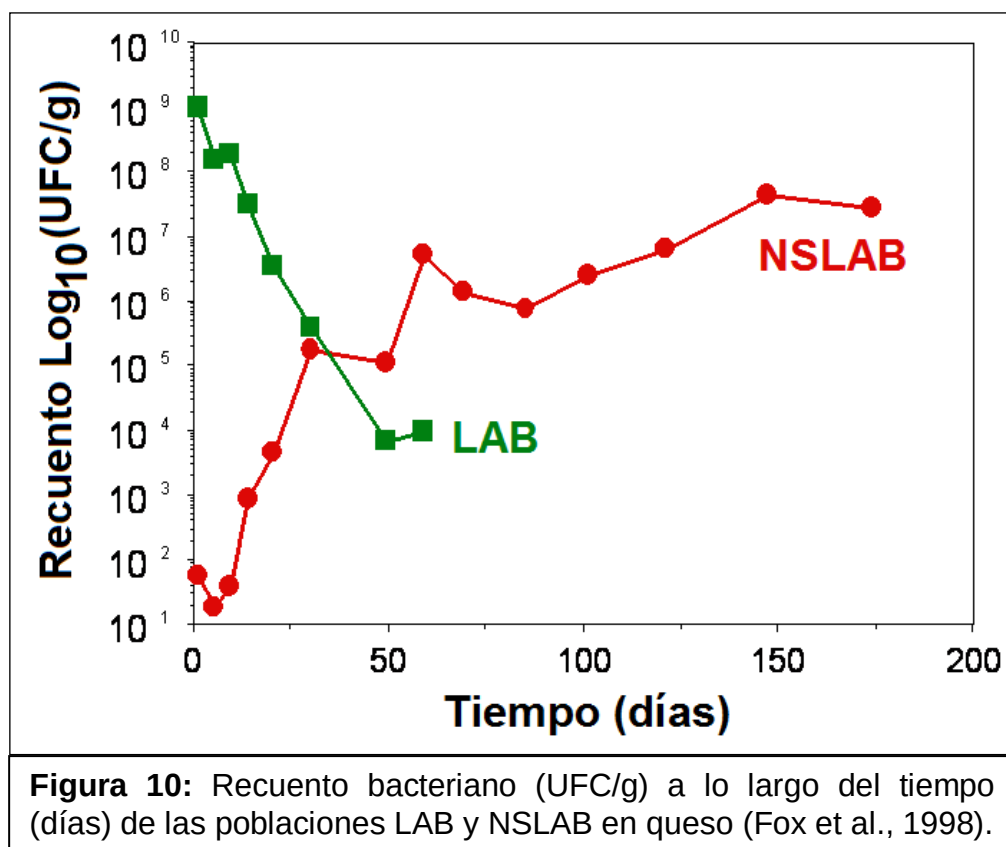
1.9.3 Desarrollo y contribución de las NSLAB en quesos

Las NSLAB constituyen la población dominante de la microflora presente en quesos. En su mayoría son lactobacilos heterofermentativos facultativos mesófilos (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. curvatus*), seguidos en orden de predominancia por lactobacilos heterofermentativos obligados (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri* y *L. farciminis*) y en menor número *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis* y *Leuconostoc* spp.. Al igual que otros microorganismos de la microflora nativa del queso estas bacterias acceden a la cuajada desde la leche cruda, la línea de producción lechera y otros ambientes del tambo, así como del proceso de elaboración quesera, incluyendo los equipos utilizados en los cuales las bacterias permanecen en biofilms luego de los procesos de limpieza y desinfección (Reginensi et al., 2016; Sheehan, 2013).

Durante las etapas iniciales del proceso de elaboración quesera las NSLAB tiene bajo desarrollo porque en estas condiciones las LAB son altamente competitivas y sintetizan compuestos antagonistas que previenen o reducen el crecimiento de las NSLAB, en consecuencia las LAB son la población bacteriana predominante. Los bajos recuentos bacterianos de las NSLAB en leche y su metabolismo heterofermentativo explican la baja contribución de estos microorganismos al proceso de acidificación de la leche. Sin embargo las NSLAB soportan la pasteurización y el ambiente estresante desarrollado durante la elaboración quesera (stress ácido, oxidativo, osmótico y calórico) permaneciendo en la cuajada a niveles menores a 10^2 ufc/mL.

En los primeros 10 a 20 días de maduración la elevada adaptación de las NSLAB a las condiciones hostiles del queso les permite proliferar, manteniendo un crecimiento sostenido durante los tres primeros meses y convertirse en la microflora dominante con recuentos de 10^6 - 10^8 ufc/g de queso que permanecen casi invariables hasta el final del proceso. Cabe mencionar que en ciertas variedades de quesos, por ejemplo los de tipo Suizo, las NSLAB presentan una etapa de proliferación y una posterior fase de reducción en los recuentos, por el desarrollo de otros microorganismos adjuntos (Casey et al., 2006; Franciosi et al., 2008; Kołakowski et al., 2012; Hill y Kethireddipalli, 2013; Reginensi et al., 2016).

En cambio los recuentos de LAB que al inicio de la maduración se encuentran en 10^8 - 10^9 ufc/g comienzan a decrecer a las pocas horas o días de obtenida la cuajada llegando a reducirse en dos o más unidades logarítmicas, debido a que el ambiente se vuelve hostil como resultado de la disminución del pH, reducción de la actividad de agua, cambio del potencial de oxidorreducción del queso, temperatura de maduración, baja disponibilidad de carbohidratos fermentables y alto contenido de NaCl. La diferencia en las condiciones fisicoquímicas a las cuales las LAB y NSLAB son capaces de predominar determina que sus cinéticas de crecimiento y muerte suelen ser opuestas (Fig. 10) (Settanni y Moschetti, 2010; Gatti et al., 2014; Reginensi et al., 2016).



Uno de los factores que afectan la capacidad de crecimiento de los microorganismos en los quesos es la disponibilidad de nutrientes, si bien el contenido de proteínas, aminoácidos y grasa no son limitantes para la mayoría de éstos, los niveles de carbohidratos son relativamente bajos. La lactosa residual es consumida por las bacterias iniciadoras durante los primeros días de la maduración quesera y los niveles de citrato son bajos (8 mmol/kg) por lo que no es una fuente de energía significativa para el crecimiento microbiano. Actualmente no se conoce la fuente de energía que permite a las NSLAB crecer activamente en estas condiciones y convertirse en la microflora predominante durante el proceso de maduración de los quesos (Beresford, 2007; Sgarbi, 2012; Reginensi et al., 2016).

Las NSLAB son capaces de catabolizar péptidos y aminoácidos. Estos compuestos se encuentran en alta concentración en los quesos como producto de la proteólisis realizada por las cepas LAB y sus endopeptidasas liberadas en la matriz del queso, por lo que se considera que dichos metabolitos son las principales fuentes de nutrientes. Por otra parte se considera que los compuestos aromáticos sintetizados por las cepas LAB sirven como sustrato para las NSLAB y regulan el crecimiento inicial de la microbiota del queso (Settanni y Moschetti, 2010; De Pasquale et al., 2016).

Las NSLAB contribuyen a mejorar las propiedades organolépticas de los quesos principalmente por medio de su actividad proteolítica y lipolítica. Los aminoácidos liberados por la acción de endopeptidasas, aminopeptidasas N-terminales, dipeptidasas y tripeptidasas de las NSLAB aportan “flavor” y lo mejoran ya que degradan péptidos responsables del sabor amargo excesivo. Además en el catabolismo de los aminoácidos producidos se originan compuestos aromáticos volátiles: aminas, indoles, aldehídos, alcoholes, compuestos fenólicos y sulfurados y ácidos carboxílicos (Settanni y Moschetti,

2010; Bove et al., 2012; Yarlagadda, 2014; Ricciardi et al., 2015). Por otra parte, la actividad lipolítica de las NSLAB genera ácidos grasos libres que confieren sabor y aroma, además el catabolismo de los ácidos grasos origina otros compuestos claves para el mejoramiento de la textura y “flavor”: lactonas, ésteres, metil cetonas y alcoholes secundarios (Hassan et al., 2013; Padilla, 2014).

La fermentación del citrato que ciertas NSLAB realizan también aporta compuestos que incrementan el “flavor” del queso. La mayoría de las cepas co-metabolizan el citrato junto con azúcares fermentables, en estas condiciones se genera un exceso de piruvato que es convertido en acetato y compuestos aromáticos de 4C (acetoína, 2,3-butanodiol, diacetilo y acetaldehído) que otorgan sabor y aroma. Asimismo los compuestos de 4C generados son precursores de otros componentes de sabor. En la fermentación de citrato también se produce CO₂ cuya acumulación en la masa del queso genera ojos, lo cual es positivo en las variedades en los cuales se busca dicha característica como de estilo Holandés (Sgarbi, 2012; Bermúdez et al., 2016).

La mejora de las condiciones higiénicas en la colección, conservación y transporte de la leche cruda a planta así como en las distintas etapas del proceso de elaboración quesera y la pasteurización de la leche conducen a la reducción de la diversidad y carga bacteriana de NSLAB presentes en la leche, en consecuencia el desarrollo de “flavor” producido por estas bacterias ocurre en forma más lenta. Debido a esto, se emplean cultivos iniciadores adjuntos compuestos por cepas NSLAB que logran predominar sobre las cepas NSLAB nativas de la leche y acelerar el tiempo maduración al aportar características de aroma y sabor intensos. Dado que las propiedades sensoriales de los quesos artesanales resultan del desarrollo de una población de NSLAB muy heterogénea, lograr un resultado similar empleando cultivos adjuntos es un desafío al tratarse de combinaciones de pocas cepas (Franciosi et al., 2008; Ciocia et al., 2013; Hill y Kethireddipalli, 2013).

1.9.4 Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son capaces de competir con otros microorganismos presentes en la leche mediante producción de sustancias con acción inhibitoria. Al igual que en otros grupos bacterianos la síntesis de metabolitos antimicrobianos por LAB y NSLAB es una propiedad cepa-dependiente. Las cepas de una misma especie o subespecie pueden diferir en el tipo de compuestos sintetizados o incluso cuando generan un mismo compuesto los niveles de producción pueden diferir significativamente. Como consecuencia de lo anterior la caracterización tecnológica de las cepas debe incluir una etapa de estudio de la actividad antimicrobiana para determinar su competitividad frente a microorganismos alterantes y patógenos, así como su compatibilidad con cepas presentes en los cultivos iniciadores y adjuntos empleados por la industria alimentaria (Nieto, 2010; Lorenzo y Raffo, 2015).

En forma general los compuestos inhibitorios son clasificados en dos clases: sustancias de bajo peso molecular cuando tienen menos de 1000 Da o sustancias de alto peso molecular si presentan más de 1000 Da. Las sustancias con bajo peso molecular son: ácidos orgánicos, los compuestos aromáticos acetaldehído, diacetilo y acetoína producidos en la fermentación heteroláctica de las NSLAB, D-aminoácidos, peróxido de hidrógeno, reuterina y reuterociclina. Las sustancias de alto peso molecular son compuestos de naturaleza peptídica denominados bacteriocinas (Šušković et al., 2010).

1.9.4.1 Ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos durante la fermentación ácido láctica y el descenso del pH resultante es un fenómeno clave para la inhibición de microorganismos patógenos y de deterioro en quesos y leches fermentadas. El poder inhibitorio de estas sustancias depende del tipo de ácido, el pH de la matriz alimentaria y la concentración a la cual se encuentra. A su vez, este último factor varía dependiendo de la/s especie/s o cepa/s de BAL que compone/n el fermento y las condiciones de crecimiento. Los ácidos láctico y acético constituyen los principales ácidos orgánicos generados por las BAL, sus propiedades antimicrobianas son las que están mejor caracterizadas y al contar con *status* GRAS estos ácidos son empleados en los alimentos, siendo los principales acidulantes de uso industrial (Šušković et al., 2010; Blagojev et al., 2012; Reis et al., 2012; Amenu, 2013).

Los ácidos orgánicos presentan actividad antimicrobiana porque producen acidificación del medio, en esas condiciones las moléculas de ácido se encuentran no disociadas lo que favorece su liposolubilidad, siendo capaces de atravesar la membrana celular de los microorganismos. El pH en el interior de la célula es más alto que el pKa (constante de disociación) del ácido, por lo cual las moléculas se disocian y los protones liberados se acumulan aumentando el pH intracelular. Esto provoca la desnaturalización de enzimas y otros componentes estructurales y funcionales, en consecuencia las reacciones metabólicas se detienen. Por otra parte, dependiendo del anión presente en el ácido, ocurren procesos metabólicos tóxicos adicionales. Además los ácidos orgánicos actúan aumentando la permeabilidad de la membrana celular al neutralizar su potencial electroquímico de membrana celular, resultando en la interrupción de los sistemas de transporte de sustratos (Warnecke y Gill, 2005; Vásquez et al., 2009; Djadouni y Kihal, 2012; Erginkaya et al., 2014).

Es posible aumentar la efectividad de los ácidos al emplear ciertas combinaciones de ellos, por ejemplo: ácido láctico y acético, propiónico con fórmico o láctico junto a ácido fórmico, ya que actúan sinérgicamente. El efecto sinérgico se debe a que a cualquier valor de pH los ácidos orgánicos cuyos pKa son más bajos van a encontrarse mayoritariamente en forma no disociada, debido a esto carecen de capacidad de ingresar en las células y desencadenar el mecanismo de acción, pero disminuyen el pH del medio favoreciendo que la desprotonación de los ácidos con pKa más altos de modo que potencia su acción efectora. Asimismo, los ácidos orgánicos se pueden emplear en combinación con otros compuestos antimicrobianos, por ejemplo las bacteriocinas y lograr un efecto inhibitorio mayor (Hayek et al., 2013; De Jesus, 2016).

Algunos de los microorganismos que el ácido láctico es capaz de inhibir son: *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis*, bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* y *Clostridium*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus coagulans*, *Aspergillus* sp., *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Helicobacter pylori* y *E. coli*. En cuanto al rango de acción del ácido acético comprende a variedad de microorganismos entre ellos: *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella bareilly* y miembros de la familia Enterobacteriaceae. Este ácido tiene mayor acción letal que el láctico, fórmico, cítrico y sulfúrico sobre ciertos microorganismos: *H. pylori*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *Aspergillus parasiticus* (Erginkaya et al., 2014).

A pesar que el ácido acético es más efectivo que el láctico, su uso en los alimentos se encuentra limitado por el intenso olor y sabor que otorga, a diferencia del ácido láctico que

confiere un sabor más suave. Debido a esto, la industria alimentaria suele emplear mezclas de ácido láctico y acético para compensar la acción antimicrobiana de las altas concentraciones requeridas de ácido acético por el efecto sinérgico obtenido al combinar ambos ácidos (Erginkaya et al., 2014). Además de los ácidos ya mencionados, algunas especies de BAL producen otros ácidos como el benzoico, sórbico, propiónico, 3-fenil-láctico, 4-hidroxi-fenil-láctico y el ácido indol láctico (Blagojev et al., 2012; Naz et al., 2013).

Los estereoisómeros L y D del ácido 3-fenil-láctico (PLA) al igual que el ácido 4-hidroxi-fenil-láctico (OH-PLA) tienen actividad antifúngica y antibacteriana. Dichos ácidos son respectivamente producidos a partir de fenilalanina y tirosina por algunas cepas de *Lactobacillus* spp.. De los dos isómeros la forma D-PLA tiene mayor acción antimicrobiana que la L-PLA. Algunos de los microorganismos que son susceptibles a estos compuestos son: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *E. faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, *Salmonella enterica*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.. Estos metabolitos además de presentar acción antimicrobiana, están involucrados en el desarrollo del “flavor” de los quesos (Valerio et al., 2004; Manu, 2012).

El ácido benzoico que es uno de los preservantes más empleado en la industria alimentaria, es principalmente utilizado por su acción antifúngica aunque también puede inhibir bacterias Gram-negativas. Algunos de los microorganismos inhibidos son: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.. Es producido por varias especies de LAB y NSLAB: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*, que pueden sintetizarlo a partir de ácidos de la leche como el ácido hipúrico, mediante β -oxidación de ácidos grasos o a través de la degradación de fenilalanina (Šušković et al., 2010; Reis et al., 2012; Naz et al., 2013; Yu et al., 2016).

En los quesos los ácidos láctico, acético y propiónico son los más abundantes, pero debido a sus respectivos valores de pKa: 3.08, 4.75 y 4.87 difieren en su capacidad de inhibición. En el rango de pH alcanzado por estos productos y considerando igual concentración de los tres compuestos, el ácido propiónico se encuentra en mayor porcentaje bajo la forma no disociada por su elevado pKa, en consecuencia es el que tiene mayor efectividad, mientras que el ácido láctico es el menos efectivo dado que su pKa es el más bajo por lo que se encuentre mayoritariamente en la forma disociada. Sin embargo, el ácido láctico es el principal responsable de la inhibición microbiana por encontrarse en mayor concentración, con excepción de los quesos de pasta dura (Herreros, 2010; Amenu, 2013).

La inhibición del género *Clostridium* por acidificación del medio depende de cada especie, e incluso pueden existir diferencias entre cepas de una misma especie, pero generalmente el desarrollo de *Clostridium* spp. es inhibido por debajo de pH 4,5 (Ghoddusi et al., 2013; Alvenäs, 2015). De acuerdo al estudio realizado por Bassi et al. (2009) los ácidos orgánicos también afectan la tasa de germinación de las esporas. En dicho trabajo esporas de *C. tyrobutyricum* fueron tratadas con los ácidos láctico, cítrico y acético y se determinó el grado de germinación. En base a los resultados obtenidos, las esporas tuvieron la menor tasa de germinación (17%) en presencia de ácido láctico y la mayor (29%) en ácido acético, en ácido cítrico el porcentaje de esporas germinadas fue similar al correspondiente en ácido acético (27%).

1.9.4.2 Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno las BAL producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de diferentes enzimas: flavoprotein oxidasas, NADH peroxidasas, α -glicerofosfato oxidasa, NADH oxidasa y la superóxido dismutasa. En ausencia de grupo hemo las BAL no sintetizan catalasa que degrada el H_2O_2 por lo que se acumula en el medio y puede presentar efecto citotóxico sobre bacterias, hongos y levaduras dependiendo de varios factores: concentración del compuesto, carga orgánica, pH del alimento y condiciones de temperatura. Dicha acción biocida involucra el daño del ADN celular. También es capaz de destruir esporas bacterianas pero se desconoce el modo de acción (Gaitán, 2013; Erginkaya et al., 2014; Şanlıbaba y Güçer, 2015; De Jesus, 2016).

Los mecanismos antimicrobianos ejercidos por el H_2O_2 son la peroxidación de lípidos de la membrana celular que aumenta su permeabilidad y la oxidación de grupos sulfhidrilos de las proteínas lo que provoca su desnaturalización. Asimismo el H_2O_2 es precursor de especies radicales del oxígeno que presentan actividad bactericida, por ejemplo los radicales superóxido e hidroxilo que pueden dañar el ADN (Šušková et al., 2010; Erginkaya et al., 2014; Şanlıbaba y Güçer, 2015). El peróxido de hidrógeno también puede desintegrar biofilms facilitando la destrucción de las células. En combinación con ácido acético o peracético tiene efecto bactericida y fungicida. Mezclas de H_2O_2 con ácido láctico o cítrico logran eliminar *E. coli*, *S. enterica* y *L. monocytogenes* (Martin y Maris, 2012a).

Se han aislado varias cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* capaces de inhibir mediante producción de H_2O_2 a *S. aureus*, *Pseudomonas* sp. y otras bacterias psicrótrofas provenientes de alimentos. En condiciones de refrigeración aislamientos de distintos géneros de BAL productoras de H_2O_2 han inhibido el crecimiento de microorganismos psicrótrofos y patógenos alimentarios (Reis et al., 2012). También se determinó que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* es una de las BAL que genera mayor producción de H_2O_2 . En un estudio posterior se comprobó la capacidad de una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* de inhibir el desarrollo de *E. coli* O157:H7 en carne cruda de pollo durante su refrigeración y que el principal responsable de dicha inhibición era el H_2O_2 (De Jesus, 2016).

El empleo del peróxido de hidrógeno como preservante está mayormente estudiado en leche cruda, en la cual conforma junto con iones tiocianatos de la dieta del animal y la enzima lactoperoxidasa un sistema antimicrobiano denominado “sistema lactoperoxidasa”. Sin embargo el uso potencial de este compuesto en otros alimentos es limitado porque puede afectar las propiedades organolépticas del producto al provocar reacciones de rancidez, decoloración o enverdecimiento (Vásquez et al., 2009).

1.9.4.3 Acetaldehído, diacetilo y acetoína

Los compuestos aromáticos diacetilo, acetaldehído y acetoína son producidos por varias cepas de BAL, estos metabolitos también presentan actividad antimicrobiana. El diacetilo y la acetoína son productos de la fermentación del citrato realizada por varias cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), *Pediococcus* y *Lactobacillus*. El precursor de ambos compuestos, α -acetolactato, se convierte en diacetilo por descarboxilación oxidativa, mientras que la acetoína se produce por descarboxilación del α -acetolactato y por reducción del diacetilo. Tanto el diacetilo como la

acetoína presentan actividad inhibitoria sobre bacterias Gram-negativas, hongos y levaduras y en menor grado sobre bacterias Gram-positivas. Se conoce el modo de acción del diacetilo, este consiste en impedir la utilización de arginina al asociarse a proteínas de unión a arginina. La concentración de diacetilo necesaria para inhibir microorganismos Gram-negativos es 200 µg/mL, pero se requieren 300 µg/mL para que presente acción bacteriostática contra Gram-positivos (García-Quintáns et al., 2008; Šušković et al., 2010; Erginkaya et al., 2014).

Se ha determinado que el diacetilo presenta actividad antibacteriana contra *Listeria*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Aeromonas* y *Bacillus*. Su empleo en alimentos como bioconservante es limitado debido a que las concentraciones sensorialmente aceptables son 2 - 7 µg/mL. Además los niveles de diacetilo producidos por las bacterias ácido lácticas suelen ser de 2 - 4 µg/mL. Sin embargo, puede ser utilizado en combinación con otros agentes antimicrobianos aumentando la efectividad de los mismos (Ramírez, 2005; Gaitán, 2013; Erginkaya et al., 2014; De Jesús, 2016).

El acetaldehído es un compuesto de sabor presente en queso, yogur, vino y cerveza que también posee acción antimicrobiana. Es producido principalmente por BAL a partir del piruvato generado en distintas vías metabólicas, como la fermentación heteroláctica, fermentación de citrato y el catabolismo de aminoácidos, aunque la conversión de treonina en acetaldehído y glicina es la que genera mayores niveles de este metabolito, esta reacción es catalizada por la enzima treonina aldolasa. Algunos ejemplos de BAL que producen acetaldehído de esta forma son *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, en cambio *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* lo generan por fermentación de citrato (Mora y García, 2007; Papagianni, 2012; Erginkaya et al., 2014).

En productos lácteos el acetaldehído logra inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* a concentraciones de 10 - 100 ppm. En este tipo de alimentos fermentados el acetaldehído producido puede alcanzar una concentración de 25 ppm, ejerciendo actividad inhibitoria contra estos microorganismos. El mecanismo de acción de este compuesto sigue sin determinarse, se considera que puede involucrar la capacidad del acetaldehído adicionado de sustituir el acetaldehído intracelular cuando la permeabilidad de la membrana celular es alterada por etanol (Mora y García, 2007; Erginkaya et al., 2014).

1.9.4.4 Reuterina

L. reuteri produce β-hidroxipropionaldehído o 3-HPA un compuesto antimicrobiano también denominado reuterina mediante un paso intermedio en la conversión de glicerol a 1,3-propanediol en el cual participa la vitamina B12 y es catalizado por la enzima glicerol deshidratasa. Esta reacción tiene lugar en microcompartimientos posiblemente, para proteger el citosol de esta sustancia. Dichos microcompartimientos se denominan “metabolosomas” y consisten en estructuras polihedricas integradas principalmente por cientos de complejos proteicos hexagonales formados por seis subunidades proteicas. En solución acuosa debido a la elevada reactividad del grupo aldehído de esta molécula puede originar otros compuestos por hidratación y dimerización, incluso es posible su deshidratación generando acroleína un producto altamente tóxico (Fig. 11) (Schaefer et al., 2010; Stevens et al., 2011; Pang et al., 2012; Gómez-Torres et al., 2014).

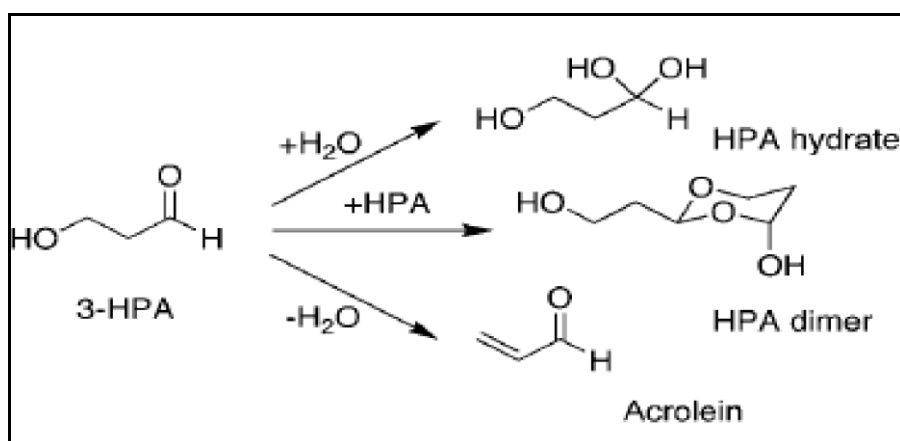


Figura 11: Compuestos antibacterianos generados a partir de la reuterina (Schaefer et al., 2010)

El mecanismo de acción antimicrobiana de la reuterina no se conoce completamente debido a su capacidad de generar otros compuestos, se ha propuesto que el grupo aldehído de 3-HPA reacciona con aminas primarias y grupos tioles de proteínas y moléculas pequeñas provocando su inactivación, otra posibilidad es la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa por la forma dimérica de la reuterina que compite con la ribosa debido a su parecido estructural, la ribonucleótido reductasa es requerida en la síntesis de desoxiligonucleótidos y por lo tanto en la síntesis de ADN (Schaefer et al., 2010).

La reuterina presenta un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram-positivos y Gram-negativos de los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Eubacterium*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella* y *Escherichia*. También ha sido reportada su bioactividad contra virus y hongos (Schaefer et al., 2010; Ávila et al., 2014). Otras características de este compuesto son su hidrosolubilidad, resistencia a enzimas proteolíticas y lipolíticas, actividad en un rango de pH amplio, que junto con su espectro de acción han generado interés en la industria alimentaria por su uso potencial como preservante alimentario o su producción *in situ* por cepas de *L. reuteri* incorporadas al producto (Gómez-Torres et al., 2014).

En leche Arqués et al. (2004) detectaron que la reuterina tiene acción bactericida contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *A. hydrophila* y en combinación con nisina presenta un efecto sinérgico sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Este compuesto también tiene sinergismo con el sistema lactoperoxidasa de la leche contra *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* (Arqués et al., 2008a). En cuajada determinaron que la acción conjunta del sistema lactoperoxidasa, nisina y reuterina es capaz de inhibir a *L. monocytogenes* y *S. aureus* durante 12 días a 10 °C (Arqués et al., 2008b).

Ávila et al. (2014) evaluaron la actividad inhibitoria de la reuterina sobre cepas de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* y determinaron que la acción anticlostridial fue superior a la desarrollada por el nitrato y la lisozima en todas las cepas evaluadas tanto en estado vegetativo como esporulado. Gómez-Torres y colaboradores (2014) demostraron en quesos la acción anticlostridial de la cepa de *L. reuteri* INIA P752 productora de reuterina al adicionarla junto con glicerol para que la producción de

reuterina tuviera lugar.

1.9.4.5 Reuteriicina

La reuteriicina es un compuesto antimicrobiano sintetizado por cepas de *Lactobacillus reuteri*. Se trata de un ácido tetramérico N-acilado que tiene carga negativa y es altamente hidrofóbico, su peso molecular es 349 Da. La reuteriicina puede tener actividad bacteriostática o bactericida sobre bacterias Gram-positivas, entre éstas: *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *E. faecium*, *Listeria innocua*, *Bacillus* spp. y sus esporas, así como otros miembros del género *Lactobacillus*. También es capaz de inhibir a *E. coli* y *Salmonella* si se emplea en combinación con otros factores como bajo pH o alta concentración salina que provocan la disrupción de la membrana celular externa. En la actualidad sólo se han aislado cuatro cepas de *L. reuteri* productoras de reuteriicina, dichos aislamientos provinieron de la misma masa fermentada mantenida por propagación (Corsetti y Settanni, 2007; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Lin et al., 2015).

1.9.4.6 D-aminoácidos

Varias especies bacterianas entre ellas las comprendidas dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas pueden producir D-aminoácidos extracelulares que tienen acción antimicrobiana. La síntesis de estos compuestos en bacterias ácido lácticas requiere de enzimas denominadas aminoácido racemasas que catalizan la conversión de L- o D-aminoácidos en sus respectivos isómeros ópticos y otras enzimas involucradas en el metabolismo de D-aminoácidos como transaminasas y oxidoreductasas (Bardaweel, 2014; Mutaguchi et al., 2016).

Se han identificado los D-aminoácidos sintetizados por algunos aislamientos de bacterias ácido lácticas. En vinagre de tomate fueron detectadas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus salivarius* productoras de altos niveles de D-alanina, así como aislamientos de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus brevis* productores de otros D-aminoácidos. En sake, se encontraron las cepas *L. sakei* NBRC 15893 que generó D-aspartato, D-alanina y D-glutamato y *L. mesenteroides* subsp. *sake* NBRC 102480 productor de D-alanina, D-lisina y D-glutamato. Por otra parte, aislamientos de *Oenococcus oeni* provenientes de vino blanco sintetizaron D-lisina, D-aspartato y D-alanina (Mutaguchi et al., 2016).

El mecanismo de acción antimicrobiano de los D-aminoácidos es poco conocido. Se sabe que las bacterias productoras liberan estos compuestos durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y tienen control sobre el ensamblaje y modificación de la pared celular. Una hipótesis es que estos compuestos alteran la estructura de la pared bacteriana al remplazar la D-alanina terminal del ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano, otra posibilidad es modificación de la síntesis de peptidoglicano por D-aminoácidos. Por otra parte, ciertos D-aminoácidos inhiben la formación de biofilm al interferir con la síntesis proteica y/o provocan la desintegración de los biofilm existentes. Estos efectos también han sido evidenciados en biofilms de consorcios bacterianos cuando se aplicaron mezclas de D-aminoácidos lo que hace muy posible que determinados D-aminoácidos sean efectivos contra determinadas bacterias (Bardaweel, 2014; Li et al., 2015b; Li et al., 2016)

1.9.4.7 Bacteriocinas

Algunas BAL también pueden sintetizar compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica a nivel de los ribosomas denominados bacteriocinas. Estos compuestos presentan efecto bactericida o bacteriostático sobre microorganismos filogenéticamente cercanos a la cepa productora, la cual contiene genes que le confieren resistencia para sus propias bacteriocinas. La producción de bacteriocinas no es exclusiva de las bacterias ácido lácticas, existen otras bacterias Gram-positivas así como Gram-negativas capaces de sintetizarlas, de hecho se estima que el 99% de las bacterias sintetizan al menos una bacteriocina. Dicha producción ocurre durante la fase de crecimiento exponencial o hacia el final de ésta y cesa en la fase estacionaria (Beristain-Bauza et al., 2012; Abbasiliasi et al., 2017).

En función del rango de microorganismos inhibidos, el espectro de inhibición de las bacteriocinas se puede clasificar en tres categorías: estrecho, intermedio o amplio. La mayoría de las bacteriocinas de BAL son de espectro estrecho ya que inhiben cepas pertenecientes al mismo género de la cepa bacteriocinogénica. Sin embargo existen bacteriocinas con espectro intermedio, las cuales son activas sobre otros géneros pertenecientes a BAL. Así como algunas de amplio espectro que además de inhibir BAL tienen efecto sobre otros géneros bacterianos filogenéticamente próximos (Beristain-Bauza et al., 2012; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Las bacteriocinas de BAL se caracterizan por ser compuestos catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos constituidos por 20 a 60 aminoácidos. Desde el punto de vista molecular, los genes estructurales y los elementos genéticos que codifican las proteínas de transporte y/o de secreción de dichas moléculas, enzimas responsables de modificaciones post-traduccionales en las bacteriocinas, proteínas reguladoras, así como resistencia del microorganismo productor para la propia bacteriocina (factores de inmunidad) están organizados en *clusters*, siendo todos ellos expresados simultáneamente. Estos determinantes genéticos se pueden encontrar localizados en el cromosoma bacteriano, aunque frecuentemente se hallan en elementos genéticos móviles: plásmidos o transposones capaces de ser transferidos horizontalmente a otras cepas de BAL (Devi y Halami, 2012; de la Fuente-Salcido et al., 2014; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

1.9.4.7.1 Mecanismos de acción

Actualmente se proponen como posibles mecanismos de acción de las bacteriocinas la formación de poros en la membrana celular, la inhibición de la germinación de esporas bacterianas, inhibición de la formación de septo durante la división celular o por acción sobre blancos intracelulares, en este sentido hay bacteriocinas capaces de bloquear el metabolismo del ADN, ARN o de las proteínas, también se ha propuesto como mecanismo antibacteriano la activación de enzimas autolíticas que provocan autólisis celular. El mecanismo de inhibición más conocido es la generación de poros en la membrana celular, mediante los que se pierden iones y metabolitos esenciales, se altera la fuerza protón motriz necesaria para la generación de energía y se detiene la síntesis de ADN, ARN y proteínas, conduciendo eventualmente a la muerte celular (Tonarelli y Simonetta, 2013; de la Fuente-Salcido et al., 2014; Cavera et al., 2015; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

En base a la naturaleza anfipática de la mayoría de las bacteriocinas se considera que

este mecanismo ocurre por interacciones electrostáticas entre residuos catiónicos presentes en el extremo C o N-terminal, dependiendo de la bacteriocina, con receptores específicos de la membrana de carga negativa, los cuales son conservados a nivel de clase o subclase de bacteriocina. A su vez las regiones hidrofóbicas de los péptidos antimicrobianos permiten la inserción de éstos en la membrana celular (Cheng et al., 2014; de la Fuente-Salcido et al., 2014; Jiménez, 2015; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016). Es importante señalar que algunas bacteriocinas como la nisina interactúan con la bicapa lipídica mediante el lípido II, el transportador del monómero N-acetilglucosamina-N-acetilmurámico, precursor de la pared de peptidoglicano, por lo cual pueden desencadenar dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y/o formación de poro en la membrana celular. En el caso de la nisina, el mecanismo activado tras la unión al lípido II depende de la concentración de la bacteriocina presente. A baja concentración inhibe la síntesis de la pared de peptidoglicano, mientras que a alta concentración el lípido II media la formación de poros en la membrana celular (de la Fuente-Salcido et al., 2014; Perez et al., 2015; Chikindas et al., 2018).

Por otra parte, la nisina y otras bacteriocinas de la misma clase (lantibióticos) tienen acción inhibitoria sobre la germinación de las esporas bacterianas. En la actualidad existe poco conocimiento respecto a la interacción de las bacteriocinas con las esporas y la actividad anti-espora desencadenada. Se sabe que algunas bacteriocinas actúan sobre esporas que no iniciaron el proceso de germinación, denominadas dormantes, por lo que tienen efecto esporicida, otras en cambio presentan acción esporostática porque inhiben las esporas que iniciaron el proceso de germinación. También hay bacteriocinas capaces de afectar la tasa de germinación de la espora (Egan et al., 2016). En este mecanismo el lípido II ha sido propuesto como molécula de anclaje para las bacteriocinas en las esporas. En las esporas que se encuentran en etapa de germinación se considera que existe una reacción entre grupos sulfhidrilos de proteínas presentes en la envoltura de la espora y residuos deshidratados de la bacteriocina, que probablemente actúan como aceptores de electrones (Takala y Saris, 2007; Gut et al., 2011; Roces et al., 2012).

1.9.4.7.2 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con alta diversidad estructural, peso molecular y mecanismos de acción lo que ha llevado a la necesidad de clasificarlas. En base a sus características fisicoquímicas se han planteado distintos criterios de clasificación, aunque ninguno de ellos es completamente satisfactorio dado que existen péptidos que no presentan todas las características de una misma categoría. La clasificación dada aquí considera los criterios más actuales y es resumida en la Figura 12. En forma general las bacteriocinas se diferencian en dos categorías principales: lantibióticos que se caracterizan por contener aminoácidos con modificaciones post-traduccionales y no lantibióticos cuyos aminoácidos no sufren modificaciones post-traduccionales. A su vez, las bacteriocinas se asignan a las clases: I, II o III. La clase I está conformada por todos los lantibióticos mientras que los no lantibióticos integran las clases II y III. Asimismo dentro de cada clase los péptidos se encuentran agrupados en subclases (Tonarelli y Simonetta, 2013; de la Fuente-Salcido et al., 2014; Del Aguila et al., 2016; Johnson et al., 2017).

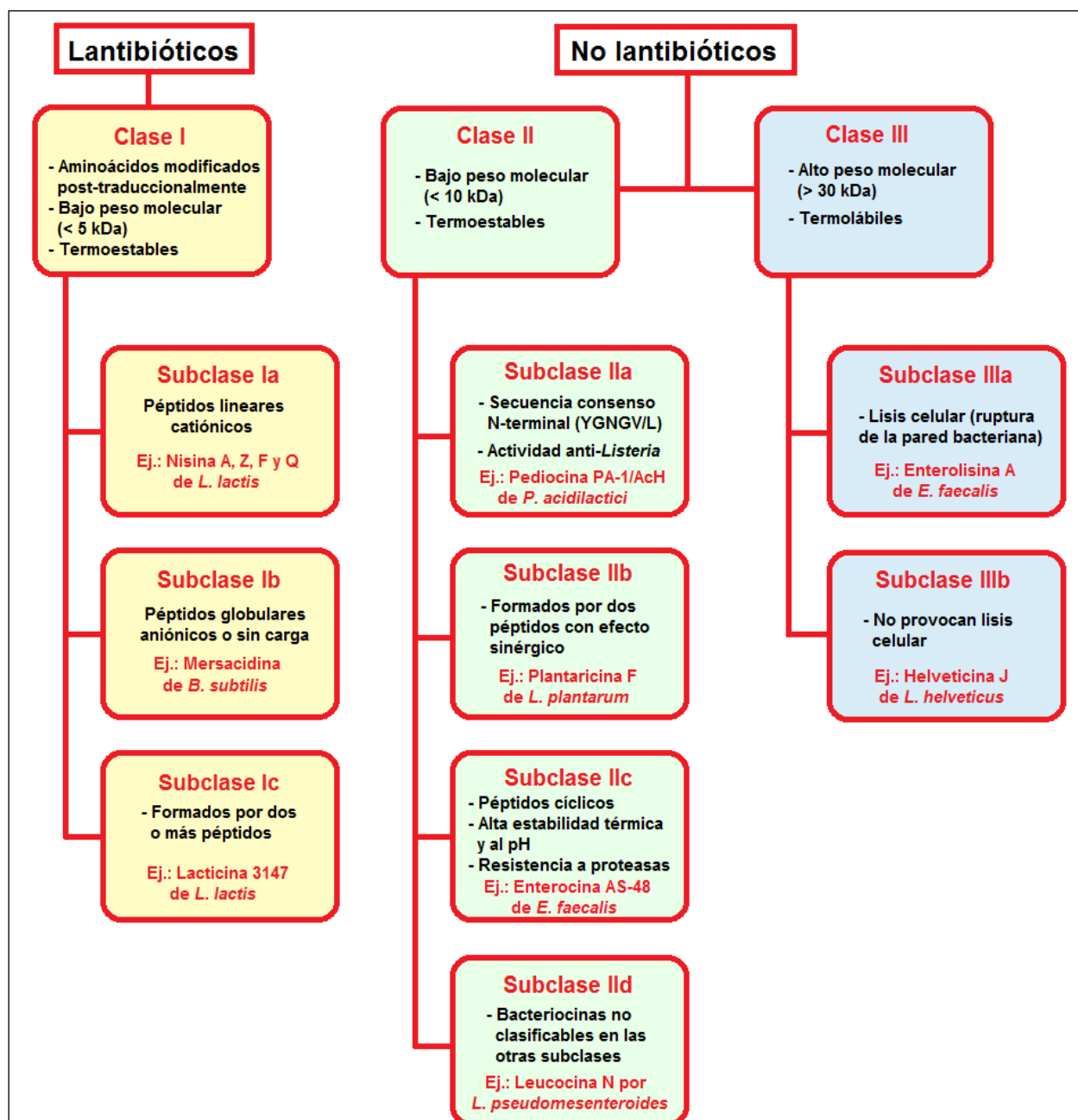


Figura 12: Clasificación de bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram-positivas (Johnson et al., 2017).

Los péptidos antimicrobianos pertenecientes a la clase I están formados por 19 a 38 aminoácidos y se caracterizan por su termoestabilidad y tener bajo peso molecular (<5 kDa). Los aminoácidos modificados post-traduccionalmente que principalmente contienen son dehidrobutiruna y dehidroalanina que se originan por deshidratación de la treonina y serina, respectivamente. Estos aminoácidos modificados producen a su vez β -metil-lantionina y lantionina mediante condensación con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas, debido a esto se forman anillos en la estructura de las bacteriocinas. La clase I está compuesta por las subclases Ia, Ib y Ic. Los péptidos pertenecientes a la subclase Ia son catiónicos, lineales o elongados y actúan inhibiendo la síntesis de pared celular al unirse al lípido II o mediante unión al lípido II y posterior formación de poro en la membrana celular. El representante característico de este grupo es la nisina. Los lantibióticos de la

subclase Ib son péptidos hidrófobos y globulares que suelen actuar inhibiendo enzimas. Suelen presentar una estructura más rígida que los de la subclase Ia. No se han identificado lantibióticos Ib producidos por cepas BAL. La subclase Ic corresponde a lantibióticos formados por dos o más péptidos modificados que deben estar asociados para que exista actividad antibacteriana (Beristain-Bauza et al., 2012; Tonarelli y Simonetta, 2013; Olvera-García et al., 2015; Johnson et al., 2017).

La nisina A se descubrió en 1928 y fue la primer bacteriocina descrita en BAL; es la mejor caracterizada de la clase I y constituye el péptido de referencia de la subclase Ia. Consiste en un péptido lineal, catiónico de 34 aminoácidos con cinco anillos de lantionina, cuyo peso molecular es 3353 Da. Es producido por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. En la actualidad se conocen ocho tipos de nisinas: A, Z, Q, F, U, U2, H y P que difieren en ciertos aminoácidos de sus secuencias aminoacídicas. En la Tabla 5 se indican las especies de BAL productoras de dichas variantes, así como el peso molecular y la secuencia de aminoácidos de las mismas (Draper et al., 2015; O'Connor et al., 2015; Del Aguila et al., 2016).

Tabla 5: Variantes de nisina conocidas. Se indican las especies de BAL productoras, la secuencia aminoacídica y el peso molecular (PM) de cada bacteriocina. Los aminoácidos que difieren en las secuencias respecto a la nisina A están resaltados en rojo y subrayados (O'Connor et al., 2015).

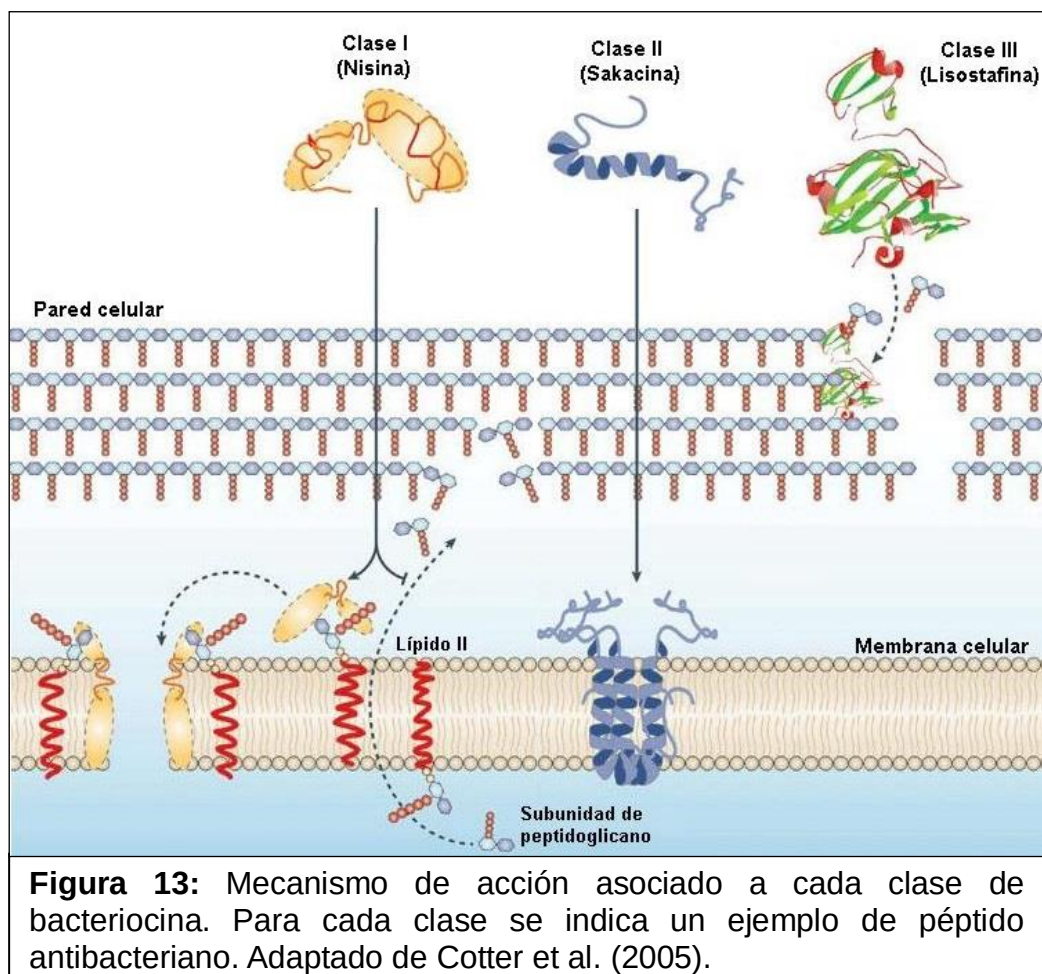
Variante	Microorganismo	Secuencia	PM (Da)
A	<i>Lactococcus lactis</i>	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK	3352
Z		ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATC <u>N</u> CSIHVSK	3331
F		ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATC <u>NCS</u> <u>V</u> HVSK	3315
Q		ITSISLCTPGCKTG <u>V</u> LMGCN <u>L</u> KTATC <u>NCS</u> <u>V</u> HVSK	3327
H		<u>E</u> TSIS <u>M</u> CTPGCKTGALM <u>I</u> CN <u>Y</u> KTATCHCSI <u>K</u> VSK	3453
U	<i>Streptococcus uberis</i>	ITS <u>K</u> SLCTPGCKTG <u>I</u> LM <u>I</u> C <u>P</u> <u>L</u> KTATC <u>G</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>G</u>	3029
U2		<u>V</u> TS <u>K</u> SLCTPGCKTG <u>I</u> LM <u>I</u> C <u>P</u> <u>L</u> KTATC <u>G</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>G</u>	3015
P	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> <i>Streptococcus suis</i>	<u>V</u> TS <u>K</u> SLCTPGCKTG <u>I</u> LM <u>I</u> C <u>A</u> <u>I</u> KTATC <u>G</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>G</u>	2989

La clase II agrupa péptidos constituídos por 37 a 48 aminoácidos sin modificaciones post-traduccionales, tienen bajo peso molecular (<10 kDa) y son termoestables. El modo de acción de estos es la formación de poros en la membrana celular. Debido a la alta heterogeneidad de esta clase existen cuatro subclases: IIa, IIb, IIc y IId. Los péptidos de la subclase IIa se caracterizan por presentar actividad anti-*Listeria* y contener una porción N-terminal de carácter catiónico que tiene una secuencia consenso (YGNGVXC) denominada "caja de la pediocina" y una porción C-terminal menos conservada de naturaleza hidrofóbica y anfipática. La caja de la pediocina tiene plegamiento en lámina β y es responsable de la unión de la bacteriocina a la superficie celular, mientras que el dominio efector se ubica en el extremo C-terminal. La pediocina PA-1 que es producida por *Pediococcus acidilactici*, es la bacteriocina mejor caracterizada de la subclase IIa, su espectro de inhibición abarca a *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *S. aureus*.

Las bacteriocinas de la subclase IIb están formadas por dos péptidos que en conjunto tienen la máxima actividad antimicrobiana mientras que separados presentan escasa o

nula acción inhibitoria. Generalmente son péptidos catiónicos pero que contienen regiones hidrofóbicas y/o anfipáticas. La subclase IIc está constituida por péptidos cíclicos que resultan de la unión covalente entre sus extremos N y C terminales. Esta ciclación mejora la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas y aumenta su estabilidad ante el calor, pH y acción de proteasas. Algunos autores proponen la creación de una nueva clase para las bacteriocinas de la subclase IIc. La subclase IId es heterogénea ya que agrupa los péptidos de la clase II que no pueden ser clasificados en las otras categorías, se trata de péptidos únicos lineales que carecen de la caja de la pediocina (Reviriego, 2009; Beristain-Bauza et al., 2012; Tonarelli y Simonetta, 2013; Jiménez, 2015; Nes et al., 2015; Egan et al., 2016; Turgis et al., 2016).

La clase III está integrada por bacteriocinas de alto peso molecular (≥ 25 kDa) que son generalmente termolábiles, razón por la cual no son de gran interés para la industria alimentaria. Tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 60 °C durante 10 a 15 min. inactivan completamente a los péptidos. Se pueden diferenciar en dos subclases: bacteriocinas líticas también denominadas bacteriolisinas (IIIa) y bacteriocinas no líticas (IIIb). Las bacteriolisinas actúan como endopeptidasas clivando el peptidoglicano de la pared celular. Tienen un dominio C-terminal que media la unión con la célula blanco y una porción N-terminal catalítica homóloga a la familia M37/M2 de las endopeptidasas. Las bacteriocinas no líticas presentan mecanismos de acción no líticos que son particulares de cada bacteriocina, por ejemplo mediante disipación de la fuerza protón motriz que conduce a la falta de ATP y eventualmente provoca la muerte celular (Brantes, 2011; Azevedo et al., 2015; Jiménez, 2015; Olivera-García et al., 2015; Johnson et al., 2017). En la Figura 13 se esquematizan los mecanismos de acción asociados a las tres clases y se mencionan ejemplos de bacteriocinas producidas por BAL.



1.9.4.7.3 Estrategias para incorporar las bacteriocinas en los alimentos

En todos los géneros de BAL de importancia comercial (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Carnobacterium*) se han detectado cepas productoras de bacteriocinas. El aislamiento de cepas BAL bacteriocinogénicas con acción inhibitoria sobre microorganismos de deterioro y/o patógenos es de gran interés para la industria alimentaria por tratarse de compuestos naturales producidos por bacterias con status GRAS nativas de la leche y productos elaborados. Asimismo las bacteriocinas presentan acción antimicrobiana a dosis baja (10 ppm), no son alérgenos ni tienen efecto tóxico en el consumidor y no afectan la microflora del tracto intestinal ya que son degradadas por las proteasas digestivas. Además no tienen impacto medioambiental porque son rápidamente degradadas. Por otro lado, en comparación a las bacteriocinas sintetizadas por Gram-negativos tienen espectros de inhibición más amplios (Beristain-Bauza et al., 2012; Tonarelli y Simoneta, 2013; de la Fuente-Salcido et al., 2014).

En los alimentos las bacteriocinas frecuentemente generan reducciones en los recuentos de microorganismos susceptibles de 1 a 4 órdenes logarítmicos. En la elaboración quesera debe descartarse la presencia de acción inhibitoria sobre las cepas *starters* lo cual puede enlentecer la formación de la cuajada y/o modificar el proceso de maduración. Empleadas como parte de sistemas de barreras en combinación con otros factores de estrés como la concentración de NaCl, ácidos orgánicos, agentes quelantes como EDTA, tratamiento térmico, alta presión y atmósfera actúan sinérgicamente, permitiendo ampliar el rango de acción de estos compuestos, incluso sobre bacterias Gram-negativas que son resistentes debido a la protección conferida por los lipopolisacáridos de la membrana celular externa. Estos compuestos contribuyen a reducir la intensidad de tratamientos tecnológicos y/o la adición de preservantes químicos pero manteniendo la calidad microbiológica de los productos elaborados. Las bacteriocinas carecen de impacto sobre las propiedades nutricionales del producto y al tratarse de sustancias incoloras e insípidas no alteran sus características organolépticas. Debido a todo lo anterior constituyen una estrategia para atender la necesidad creciente de los consumidores por productos menos procesados, con alto valor nutritivo y bajo contenido de aditivos químicos (Gutiérrez, 2005; Arias et al., 2013; Tonarelli y Simonetta, 2013; Prudêncio et al., 2015; Martínez et al., 2016).

Cuando se utilizan combinaciones de bacteriocinas éstas también actúan sinérgicamente presentando mayor actividad inhibitoria que la ejercida por cada bacteriocina en forma individual. También la utilización de mezclas de péptidos antimicrobianos reduce la aparición de resistencia bacteriana sobre todo cuando las bacteriocinas difieren en sus mecanismos de inhibición. Sin embargo, dado que varias investigaciones han reportado la ocurrencia de resistencia cruzada entre diferentes bacteriocinas, siendo más frecuente entre compuestos de la misma clase, es necesario testear la ocurrencia de resistencia cruzada cuando las bacterias se vuelven resistentes a uno de los péptidos (Tonarelli y Simonetta, 2013; Bastos et al., 2015).

La producción de las bacteriocinas para su agregado en los alimentos puede ser en forma *ex situ* o *in situ*. La producción *ex situ* consiste en cultivar el microorganismo bacteriocinogénico a escala industrial, obtener el sobrenadante y someterlo a procesos de concentración y purificación para obtener la bacteriocina purificada o semi-purificada que es agregada en el producto. Esta estrategia permite establecer con exactitud la concentración de bacteriocina en el producto, sin embargo existen limitaciones legales sobre el uso de las bacteriocinas como aditivos alimentarios exigiéndose validaciones muy exhaustivas para que logren ser aprobadas para este fin. Las únicas bacteriocinas

disponibles comercialmente son la nisina y la pediocina PA-1, pero sólo la nisina ha logrado cumplir todos los requerimientos, teniendo status GRAS y aprobación por los organismos FDA y OMS, además de estar en la lista de aditivos permitidos de la Unión Europea como bioconservante de alimentos. En el caso de la Pediocina PA-1, su uso está restringido a ciertos productos alimentarios (Campos et al., 2013; Cheng et al., 2014; Renye y Somkuti, 2015; Martínez et al., 2016).

Para obtener la bacteriocina con un rendimiento adecuado en el menor tiempo posible y a bajo costo, es necesario cultivar la cepa bacteriocinogénica bajo condiciones que garanticen la máxima producción del metabolito, lo que usualmente está asociado a la fase de crecimiento exponencial, sin embargo este comportamiento es cepa dependiente. Si bien en la mayoría de los casos la síntesis del compuesto antibacteriano se correlaciona con la producción de biomasa, en algunos casos la síntesis del péptido comienza cuando el cultivo alcanza la etapa estacionaria. Existen varios factores que afectan la tasa de producción de bacteriocina que deben ser optimizados: las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el medio de cultivo, la concentración de los nutrientes, pH del medio, las condiciones de temperatura, agitación y aereación del cultivo y tipo de producción dependiendo si se realiza en batch, fed-batch o cultivo continuo (Abbasilasi et al., 2017).

La producción *ex situ* tiene como desventajas que los procesos aplicados son costosos, consumen mucho tiempo y suele ser difícil lograr rendimientos aceptables. Debido a esto, la producción *in situ* es la estrategia más empleada para incorporar la bacteriocina en el alimento y puede realizarse de dos maneras: inoculando la cepa bacteriocinogénica en la matriz del alimento para que produzca el compuesto durante su desarrollo o adicionando al alimento a procesar un ingrediente previamente fermentado por el microorganismo productor de la bacteriocina. La incorporación de la cepa en el alimento requiere que esta sea compatible con el cultivo *starter* y no afecte las características sensoriales del producto elaborado. Varios factores condicionan la efectividad de la producción *in situ*: pérdida espontánea de la capacidad de producción, presencia de bacteriófagos para los cuales la cepa biocontroladora es sensible y microbiota nativa del alimento que puede inhibir el desarrollo del microorganismo productor (Campos et al., 2013; de la Fuente-Salcido et al., 2014; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Además de los factores previamente descritos se deben tener en cuenta las características de la matriz del alimento que pueden afectar la actividad biológica de la bacteriocina, por ejemplo el pH si se encuentra fuera del rango en que el compuesto es biológicamente estable, la presencia de proteasas en el producto que pueden degradar la bacteriocina, o la reacción del compuesto antimicrobiano con componentes del alimentos (lípidos o proteínas de éstos) (Campos et al., 2013; Renye y Somkuti, 2015).

1.9.5 Bacterias ácido lácticas con acción anticlostridial

Una estrategia propuesta para controlar el desarrollo de *Clostridium* spp. en quesos y evitar la aparición del defecto de hinchazón tardía es el empleo de cepas de BAL iniciadoras o adjuntas con acción anticlostridial. En consecuencia la detección de aislamientos de BAL autóctonas de leche y otros productos lácteos capaces de inhibir *Clostridium* spp. y que sean compatibles con el proceso de manufacturación quesera es un área de investigación de gran interés. Existen varias cepas de BAL bacteriocinogénicas aisladas de estos productos cuyos espectros de inhibición, así como la fase de sus

cinéticas de crecimiento en las que ocurre la producción de las mismas han sido estudiados. Algunos de los péptidos antimicrobianos se han podido purificar y secuenciar, así como determinar la funcionalidad de los mismos y las condiciones óptimas de producción (Rossi et al., 2013, Heredia-Castro et al., 2017).

Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* empleadas en la industria alimentaria son productoras de nisina que presenta un amplio rango de acción sobre microorganismos Gram-positivos, entre ellos *Clostridium* spp. y sus esporas (Chen y Hoover, 2003; Cotter et al., 2005). Bouksaim et al. (2000) lograron producir mezclas de cultivos *starters* para la elaboración de queso Gouda compuestos por una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* productora de nisina Z y una cepa iniciadora comercial. En queso Vidagio se ha descrito el control de *C. tyrobutyricum* por la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 productora de nisina Z (Rilla et al., 2003).

Martínez-Cuestas et al. (2010) determinaron en quesos semiduros que *Lactococcus lactis* IFLP 3593 productora de lacticina 3147, inhibió el desarrollo de *Clostridium* spp., *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, además de lactobacilos heterofermentativos los cuales provocan otros problemas de hinchazón (Leroy y De Vuyst, 2010). En quesos elaborados con leche de oveja Garde et al. (2011b) lograron prevenir la germinación de esporas de *C. beijerickii* durante 120 días de maduración empleando la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 productora de nisina y lacticina 481 como cultivo *starter*.

Se han caracterizado siete bacteriocinas de *Streptococcus thermophilus*, entre ellas termofilina 347 producida por una cepa aislada de yogur (Villani et al., 1995), termofilina T de un aislamiento proveniente de queso Feta (Aktypis et al., 1998) y la termofilina 1277 producida por una cepa nativa de leche cruda que inhibe *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *B. cereus* y otras BAL (Kabuki et al., 2007). Morandi y Brasca (2012) encontraron cuatro cepas de *S. thermophilus* autóctonas de quesos tradicionales italianos con acción antimicrobiana sobre *C. tyrobutyricum*.

S. thermophilus Adria 91L580 proveniente de un queso elaborado con leche cruda es una cepa con actividad inhibitoria sobre *B. cereus*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* y *Brochothrix thermosphacta*. Mathot et al. (2003) caracterizaron la bacteriocina producida por este aislamiento y estudiaron su producción, detectando concentraciones mayores de bacteriocina al ser co-cultivado con *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Asimismo determinaron que *S. thermophilus* Adria 91L580 fue capaz de inhibir el desarrollo de *C. tyrobutyricum* en cuajada durante 20 días de maduración.

En queso Griego Kasseri se aisló la cepa *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 productora de macedocina y macedovicina y ha sido probada como cultivo adjunto en la producción quesera. La macedocina es activa contra *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, otros microorganismos de deterioro y varias especies de BAL (Georgalaki et al., 2002; De Vuyst y Tsakalidou, 2008). Anastasiou et al. (2009) evaluó la producción de esta bacteriocina a lo largo de la etapa de maduración de quesos. Con respecto a la macedovicina, ésta fue identificada por Georgalaki et al. (2013) y su espectro de inhibición incluye a *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *B. licheniformis* y estreptococos orales.

Por otra parte, la detección de NSLAB bacteriocinogénicas contra *Clostridium* spp. compatibles con el proceso de producción quesera es de particular interés, porque las LAB predominan en las etapas tempranas del proceso de manufactura pero durante la maduración su número disminuye y las NSLAB pasan a ser dominantes. Debido a esto, el uso de cepas NSLAB anticlostridiales resultaría más adecuado para prevenir el

crecimiento de *Clostridium* spp. durante la etapa de maduración (Christiansen et al., 2005; Tůma et al., 2008; Bove et al., 2012; O'Sullivan et al., 2013).

Dentro del grupo *Lactobacillus casei* se han encontrado varios aislamientos con actividad anticlostridial en quesos semiduros, mayoritariamente de *L. paracasei* (Christiansen et al., 2005). La cepa de *L. casei* LHS proveniente de vino produce una bacteriocina denominada caseicina LHS con acción sobre *C. tyrobutyricum*, *B. cereus* y otras BAL (Figueroa-González et al., 2010). También para *L. rhamnosus* GG, cepa *starter* empleada en la elaboración de alimentos probióticos, se reportó actividad antimicrobiana sobre *Clostridium* spp. (Yerlikaya, 2014).

Bogovič-Matijašić et al. (2007) lograron reducir la germinación de esporas de *C. tyrobutyricum* y la fermentación butírica en queso semiduro empleando la cepa *Lactobacillus gasseri* K 7 aislada de heces de un recién nacido. En un estudio previo se determinó que este aislamiento también inhibe a las células vegetativas de *C. perfringens* y *C. difficile* (Bogovič-Matijašić y Rogelj, 2000). Una cepa de *Enterococcus lactis* hallada en un queso italiano elaborado con leche cruda presenta acción antimicrobiana sobre *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium* y *Pseudomonas syringae*. Morandi et al. (2013) determinaron que dicho aislamiento carece de resistencia para antibióticos de importancia clínica y factores de virulencia. Por otra parte, la cepa *E. faecium* P13 aislada de embutido produce una bacteriocina perteneciente a la clase IIa denominada enterocina P que inhibe a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Pediococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. (De Kwaadsteniet et al., 2006).

Las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* denominadas plantaricinas presentan actividad antimicrobiana sobre *C. sporogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, algunas especies de Enterobacteriaceae y otras BAL, algunos ejemplos de este tipo de bacteriocinas son: plantaricina 423 de *L. plantarum* 423 aislada de cerveza de sorgo (van Reenen et al., 1998) y plantaricina TF711 producida por *L. plantarum* TF711 nativa de queso de cabra (González y Zárate; 2015). En muestras de leche cruda y quesos frescos Ortolani et al. (2010) encontraron 2 cepas de *Lactobacillus plantarum* y 18 de *L. lactis* subsp. *lactis* productoras de bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas.

Bozoudi et al. (2015) aislaron de quesos Feta tradicionales de Grecia varias cepas con actividad antibacteriana de LAB, mayoritariamente *L. lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus garvieae* y NSLAB, entre las que predominaron aislamientos del grupo *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* y *L. alimentarius*), *Lactobacillus* heterofermentativos estrictos (*L. brevis* y *L. buchneri*) y *E. faecalis*. De estos aislamientos, se detectaron cinco cepas LAB y 37 cepas NSLAB con acción inhibitoria sobre *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*.

Recientemente, Sadek et al. (2017) evaluaron en quesos procesados almacenados a 25 y 7 °C el efecto antibacteriano de *L. mesenteroides* B-118 sólo y en combinación con *L. acidophilus* (Laboratorio Chr. Hansen) y *L. curvatus* B-4562 contra *C. perfringens*. En dicho estudio determinaron que las cepas co-inoculadas lograron suprimir completamente a *C. perfringens* a los 21 días de almacenamiento en ambas condiciones de temperatura. En cambio en los quesos inoculados con *L. mesenteroides* los recuentos de *C. perfringens* fueron nulos a partir de los 30 días de almacenados a 25 °C, mientras que en los mantenidos a 7 °C ocurrió a los 21 días.

En base a los antecedentes previamente descritos, existe evidencia suficiente para

pensar que el empleo de cepas de BAL con acción antimicrobiana contra *Clostridium* spp., como cultivos *starters* o adjuntos en la elaboración de quesos, es una alternativa adecuada a los métodos empleados por la industria para prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía.

2. Objetivo general

Obtener aislamientos nativos de LAB y NSLAB, capaces de ser incorporados en la producción quesera, con características inhibitorias sobre las principales especies de *Clostridium* spp. de deterioro en productos lácteos.

2.1 Objetivos específicos:

- Evaluar la acción inhibitoria de las cepas autóctonas LAB y NSLAB seleccionadas sobre cepas nativas de *Clostridium* spp. aisladas de procesos de la producción quesera (*C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*).
- Determinar los mecanismos de acción inhibitoria de los aislamientos LAB y NSLAB seleccionados.
- Evaluar la acción de los microorganismos nativos respecto a cepas comerciales disponibles en el mercado.
- Estudiar la cinética de crecimiento y la acción antimicrobiana de las cepas con mayor actividad anticlostridial a través del tiempo.
- Analizar los efectos individuales de las cepas (sobrenadantes) respecto a la acción de lisozima sola o en combinación con éstas.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención y procesamiento de muestras

Se realizaron seis muestreos en forma bimensual de muestras de leche cruda, suero y quesos de diez queserías artesanales. En la selección de las queserías se tuvo en cuenta el uso de suero-fermento sin incorporación de iniciadores comerciales, baja utilización de inhibidores en la manufactura de quesos (nitratos y lisozima) y baja ocurrencia de hinchazón tardía en quesos de maduración larga en los últimos tres años. Las muestras de leche y suero se colectaron durante el primer año de ejecución del proyecto, mientras que los quesos de estos procesos fueron obtenidos a partir del tercer mes de maduración.

3.2 Determinación del NMP de esporas

En todas las muestras se determinó el Número Más Probable (NMP) de esporulados anaeróbios utilizando la técnica de tres tubos con tres repeticiones (Touraille y Bergère, 1974, Bergère y Sivelä, 1990, Ingham et al., 1998). A partir de las muestras de leche, queso y suero lácteo se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos con agua peptonada bufferada 0.1%. Se transfirió 0,1 mL de cada dilución a 10 mL de caldo Bryant Burkey adicionado con glucosa (0,5%) y lactato de sodio (0,18%) (Bèrgere et al., 1968; Arias, 2013). Estos tubos fueron tratados térmicamente a 80 °C durante 10 minutos, sellados con parafina y vaselina e incubados durante siete días a 37 °C. Al séptimo día se determinaron los recuentos considerando positivos los tubos que presentaron producción de gas.

3.3 Aislamiento de cepas LAB y NSLAB

Las muestras lácteas fueron sometidas a diluciones decimales seriadas, sembradas por duplicado en placas de agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) e incubadas durante cinco días a 30 y 42 °C bajo condiciones microaerofilia y anaerobiosis estricta. Por cada muestra se seleccionaron aleatoriamente cinco colonias aisladas y se analizaron sus características fenotípicas y bioquímicas (tinción de Gram y pruebas de la catalasa y oxidasa). Las colonias aisladas y puras fueron conservadas a -80 °C en medio crioprotector con glicerol (15%) para los estudios posteriores.

3.4 Selección de cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial

Se obtuvieron 130 aislamientos LAB y NSLAB a las cuales se evaluó su actividad anticlostridial por la técnica de confrontación por estrías en agar RCM (Reinforced *Clostridium* Medium). Los aislados con acción inhibitoria fueron seleccionados y evaluados por el método de difusión en agar y posteriormente mediante el método de doble capa de agar.

3.4.1 Técnica de confrontación por estría

La técnica de confrontación por estrías se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento, la cepa indicadora de inhibición *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 fue cultivada en caldo RCM por 16 horas bajo anaerobiosis y sembrada por estría en placas de agar RCM, mientras que los aislamientos a evaluar se sembraron en forma perpendicular a la anterior a partir de placas de agar MRS crecidas por 18 a 24 horas (Figura 14). Las placas fueron incubadas durante 24 a 48 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis estricta establecidas por un equipo Anoxomat Mark II (Advanced Instruments Inc., USA) con una mezcla de gases 85% N₂, 10% CO₂ y 5% H₂. La ausencia de crecimiento de *C. tyrobutyricum* permitió detectar las cepas con acción inhibitoria (Christiansen et al., 2005).

3.4.2 Método de difusión en placa

Las cepas de LAB y NSLAB a evaluar por el método de difusión en agar RCM, fueron previamente crecidas en placas de agar MRS por 24 horas en microaerofilia. A partir de tres colonias aisladas se inocularon matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL de caldo MRS y fueron incubados a 32 °C durante 16 a 18 horas. A partir de los caldos crecidos se obtuvieron los sobrenadantes (SN) por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos en refrigeración a 4 °C y se esterilizaron con filtro de 0.22 µm. Placas de agar RCM se sembraron en superficie con 100 µL de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 crecido en caldo RCM durante 16 horas y ajustado a absorbancia a 620 nm (Abs_{620 nm}) igual a 0.1 (equivalente a 10⁶ UFC/mL). En discos de papel estéril colocados en las placas sembradas se adicionaron 100 µL de los sobrenadantes obtenidos como fue detallado (Jones et. al., 2008; Matamoros et al., 2009). El sobrenadante de una cepa biopreservante de uso comercial *Lactobacillus casei* “BAL C” se empleó como control positivo de inhibición. Las placas fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis estricta lograda con el equipo Anoxomat Mark II. Al cabo de 24 o 48 horas se evaluó la capacidad anticlostridial de las cepas probadas comparando el diámetro de los halos de inhibición desarrollados respecto al generado por BAL C (Christiansen et al., 2005). En todos los estudios en los que se realizó el método de difusión en agar, el diámetro de los halos inhibitorios generados fue medido con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Los datos obtenidos (diámetro de los halos de inhibición) fueron analizados por el método estadístico One-way ANOVA (p<0.05).

3.4.3 Método de doble capa de agar

Las cepas que tuvieron mayor actividad inhibitoria se evaluaron cualitativamente por el método de doble capa de agar. Cada cepa LAB y NSLAB se creció en caldo MRS durante 24 horas a 32 °C. Diluciones seriadas decimales realizadas a partir de los caldos crecidos se sembraron en placas de MRS agar por duplicado que fueron incubadas a 37 °C durante 24 o 48 horas en microaerofilia. En forma paralela el microorganismo indicador de inhibición *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 fue crecido en caldo RCM por 16 horas y ajustado a Abs_{620 nm} igual a 0.47 (equivalente a 10⁸ UFC/mL). Por cada placa de MRS agar crecida se inocularon 100 µL del cultivo de *C. tyrobutyricum* en 7mL de agar soft nutritivo (0.7% agar) y se vertió sobre la placa de MRS agar para obtener la sobrecapa. También se realizó un control negativo de inhibición que consistió en una placa de agar MRS estéril con una sobrecapa de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755. Las placas fueron incubadas a 37

°C durante 24 o 48 horas en anaerobiosis estricta lograda con el sistema Anoxomat Mark II y posteriormente se determinó el recuento en placa de la cepa indicadora (Zhu et al., 2000; Zamara, 2003).

Los datos obtenidos (UFC/mL) fueron comparados con el recuento de esporulados anaeróbios estrictos en leche (10^3 UFC/mL), frecuentemente asociado a la aparición de hinchazón tardía en quesos, seleccionándose las cepas de BAL que permitieron recuentos de *C. tyrobutyricum* inferiores a dicha carga bacteriana (Tuma et al., 2008; Ledenbach y Marshall, 2009; Kalač, 2011; Cosentino et al, 2013; D'Incecco et al., 2018).

3.5 Identificación y caracterización genotípica de las cepas con actividad anticlostridial

Las cepas LAB y NSLAB con capacidad antimicrobiana fueron identificadas mediante secuenciación del gen del ARNr 16S. Estos aislamientos también se caracterizaron genotípicamente por las técnicas de fingerprinting: BOX-PCR, (GTG)₅-PCR, RAPD-S1 y RAPD-S4. En el caso de las cepas pertenecientes al Grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*) no diferenciables a nivel de especie por las técnicas moleculares indicadas se realizaron técnicas de PCR especie-específicas.

3.5.1 Extracción de ADN genómico

Los aislamientos LAB y NSLAB fueron crecidos en caldo MRS a 30 y 42 °C por un período de 16 horas y centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos. Los pellets resultantes se resuspendieron en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y se extrajeron los ADN con un kit comercial (Fermentas International Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción fue validada mediante electroforesis de los ADN en gel de agarosa 1% teñidos con GoodView (SDS Genetech Co. Ltd.) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.0) y visualización en transiluminador UV.

3.5.2 Secuenciación del gen del ARNr 16S

Las reacciones de amplificación del gen ARNr 16S se realizaron empleando los primers universales rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') y fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Weisburg et al., 1991) en un termociclador Corbett CG1-96 (Corbett Research Ltd., Reino Unido). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µL conteniendo Thermo buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 1 U/ µL (Fermentas, USA), 0.2 µM de cada primer y 5 µL de ADN molde. Las amplificaciones se realizaron en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 7 min, seguido por 35 ciclos consistentes cada uno de: 94 °C durante 1 min., 56 °C por 1 min. y 72 °C durante 1 min. y una extensión final a 72 °C por 10 min..

En todos los casos se incluyó un control negativo que consistió en la mezcla de reacción sin ADN molde. Los amplicones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GoodView en buffer de corrida TBE 0.5X a 10 V/cm durante 1 hora y visualizados en transiluminador UV. Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea utilizando el primer fD1 ya descrito en un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL. Para identificar los aislamientos

las secuencias de ADN obtenidas se compararon por análisis de BLAST con las existentes en la base de datos NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.5.3 Caracterización mediante técnicas de fingerprinting

3.5.3.1 Caracterización genotípica mediante RAPD-S1 y RAPD-S4

Las técnicas de RAPD-S1 y RAPD-S4 se realizaron con los primers S1 (5'-CGA CGT CAT C-3') y S4 (5'-TCA GCT GCG AG-3') respectivamente. Estos cebadores fueron seleccionados por Markiewicz et al. (2010) debido a la calidad y repetitividad de los perfiles de bandas obtenidos en dicho estudio. Cada mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo: Thermo buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 1 U/ µL, 1 µM de primer y 5 µL de ADN molde. Se incluyó un control negativo que consistió en la mezcla de reacción sin ADN molde. En un termociclador Corbett CG1-96 se efectuó el programa de amplificación comprendiendo una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 4 min., 45 repeticiones de los pasos: 94 °C por 30 seg., 32 °C durante 1 min. y 72 °C por 1 min. y una extensión final a 72 °C por 4 min.. El mismo procedimiento fue realizado con los ADNs de cepas LAB y NSLAB de referencia provenientes de leche y productos lácteos disponibles en el laboratorio. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% conteniendo GoodView utilizando buffer TBE 0.5X durante 2 horas a 10 V/cm. El marcador de peso molecular empleado fue GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). Los perfiles de bandas se visualizaron en un transiluminador UV y fueron comparados con los correspondientes a las cepas LAB y NSLAB de referencia.

3.5.3.2 Caracterización genotípica por (GTG)₅-PCR

Los ADN de los aislamientos en estudio y cepas LAB y NSLAB de referencia nativas de productos lácteos se sometieron a una técnica de rep-PCR denominada (GTG)₅-PCR utilizando (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') como cebador. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 25 µL conteniendo: Thermo buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 1 U/µL, 2 µM de primer y 5 µL de ADN molde. El control negativo de amplificación consistió en la mezcla de reacción sin el agregado de ADN molde. Todas las reacciones se efectuaron en un termociclador Corbett CG1-96 en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 7 min, seguida por 35 repeticiones de los pasos: 94 °C durante 1 min., 46 °C por 1 min. y 72 °C durante 1 min. y una etapa de terminación a 72 °C por 10 min. (Turková et al., 2012). La electroforesis de los productos de amplificación fue realizada en geles de agarosa al 1.5% conteniendo GoodView durante 2 horas a 10 V/cm en buffer TBE 0.5X. Se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder. Los patrones de bandas se visualizaron en un transiluminador UV y compararon con los pertenecientes a las cepas de referencia.

3.5.3.3 Caracterización genotípica por BOX-PCR

Para la identificación de los aislamientos mediante BOX-PCR se utilizó el primer BOX A1R (5'-CTA CGG CAA CGC GAC GCT GAC G-3'). Todas las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 25 µL constituido por: Thermo buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, 0.25 mM de

cada dNTP, Taq polimerasa 1 U/ μ L, 2 μ M de primer y 5 μ L de ADN molde. El control negativo de amplificación consistió en la mezcla de reacción sin el agregado de ADN molde. El programa de amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 y comprendió una desnaturalización a 95 °C durante 15 min. seguida por 35 repeticiones de 94 °C durante 1 min., 53 °C por 1 min. y 72 °C durante 150 seg. concluyendo con una extensión final a 72 °C por 10 min. (Adiguzel y Atasever, 2009). Este procedimiento también se realizó con los ADNs extraídos de cepas LAB y NSLAB de referencia para poder comparar e identificar los perfiles de bandas de los aislamientos en estudio. Los productos de amplificación y el marcador GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% conteniendo GoodView durante 2 horas a 10 V/cm en buffer TBE 0.5X. Los perfiles de bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.5.3.4 Análisis de los perfiles de fingerprinting

Los patrones de fingerprinting obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa de la forma ya descrita, fueron visualizados y fotografiados bajo luz UV con un sistema documentador de geles ultra-compacto (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK). Estos perfiles se analizaron y agruparon en clusters de acuerdo a la similitud entre ellos para la construcción de dendrogramas con el software "Gel Compar" versión 4.1 (Applied Maths 1998, Kortrijk) en base al Coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento no ponderado con media aritmética, denominado en inglés método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath y Sokal, 1973).

3.5.4 Identificación por técnicas de PCR especie-específicas

Los ADNs pertenecientes a las cepas del Grupo *L. casei* que no pudieron ser diferenciados a nivel de especie por las técnicas moleculares antes mencionadas, se sometieron a PCR utilizando pares de primers especie-específicos para *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Los primers para identificar *L. casei* fueron: PrI (5'-CAG ACT GAA AGT CTG ACG G-3') y Cas II (5'-GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC-3'), los cebadores PrI y Rhall (5'-GCG ATG CGA ATT TCT ATT ATT-3') se utilizaron para diferenciar *L. rhamnosus*, mientras que los pares de primers Para (5'-CAC CGA GAT TCA ACA TGG-3') y Y2 (5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') fueron empleados para detectar a *L. paracasei*. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 25 μ L conteniendo: Thermo buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 1 U/ μ L, 2 μ M de primer y 5 μ L de ADN molde. El control negativo de amplificación consistió en la mezcla de reacción sin el agregado de ADN molde.

Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Corbett CG1-96 en las condiciones descritas por Šaková et al., (2015) que consistieron en: desnaturalización a 92 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de los pasos: 95 °C durante 30 seg., 30 seg. a la temperatura de annealing adecuada para cada par de primers y 72 °C durante 30 seg. y una etapa de terminación a 72 °C por 30 seg. Los productos de amplificación esperados para *L. casei* fueron dos fragmentos de 185 y 393 pb, en el caso de *L. paracasei* un fragmento de 293 pb, mientras que para *L. rhamnosus* dos fragmentos de 186 y 399 pb. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis junto con un marcador de peso molecular GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences) en geles de agarosa 2% conteniendo GoodView en buffer TBE 0.5X durante 2 horas a 10 V/cm. Las bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.6 Determinación de los mecanismos de acción inhibitoria

Para identificar el modo de inhibición las cepas seleccionadas conservadas en medio crioprotector fueron activadas en caldo MRS y repicadas en placas de agar MRS que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. En matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL de caldo MRS se inocularon tres colonias aisladas puras. Los matraces se incubaron a 32 °C durante 16 a 18 horas. Una vez crecidos se centrifugaron a 10000 rpm por 15 min. en una centrífuga refrigerada a 4 °C. Los SN obtenidos fueron ajustados a pH 6.5 con una solución NaOH 1M, concentrados a 10X por rotaevaporación a 240 rpm y 70 °C y esterilizados con filtro de 0.22 µm (Jones et al., 2008, Matamoros et al., 2009).

La evaluación del mecanismo de la actividad inhibitoria de las cepas LAB y NSLAB contra *Clostridium* se realizó en discos de papel estéril de 0.7 cm de diámetro sobre placas de agar RCM. Para caracterizar la actividad antimicrobiana de estos aislamientos, los SN acondicionados como fue descrito se trataron en las siguientes maneras:

- 1) SN sin tratamiento (control positivo de inhibición)
- 2) SN adicionado con proteinasa K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a concentración final 2.5 mg/mL incubado a 37 °C durante 3 h., para determinar la presencia de compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica.
- 3) SN tratado con catalasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a concentración final 1.0 mg/mL incubado a 37 °C por 3 h., para establecer el efecto del peróxido de hidrógeno.
- 4) Controles negativos de inhibición que consistieron en las enzimas mencionadas a las mismas concentraciones diluidas en buffer sodio fosfato (10mM, pH 7.0).
- 5) SN sometido a 70 y 100 °C durante 15 minutos para determinar la estabilidad térmica de los compuestos inhibitorios presentes

Placas de agar RCM fueron inoculadas en superficie con 100 µL de un cultivo de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 en caldo RCM ajustado a Abs_{620 nm} igual a 0.47 (equivalente a 10⁸ UFC/mL). Discos estériles se dispusieron sobre las placas y fueron sembrados con 100 µL de cada uno de los tratamientos mencionados. La presencia de halos de inhibición se determinó luego de 48 h. de incubar las placas a 37 °C en anaerobiosis estricta (Mathot et al., 2003; Gilbreth y Somkuti, 2005; Ammor et al., 2006). Las cepas productoras de compuestos anticlostridiales distintos de ácidos orgánicos fueron seleccionadas para los posteriores estudios realizados.

3.7 Evaluación de la acción inhibitoria de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB sobre aislamientos de *Clostridium* nativos de productos lácteos.

La actividad inhibitoria de los aislamientos de LAB y NSLAB seleccionados en el punto 3.6 se estudió contra 5 aislamientos diferentes de la misma especie para *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. Las mismas fueron aisladas de productos lácteos y forman parte de la colección de *Clostridium* del laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía. Cultivos “stocks” de las cepas mencionadas se mantuvieron a -20 °C y cada dos meses fueron subcultivados (Jo et al., 2008).

La evaluación fue realizada mediante el método de difusión en placas de agar RCM. Los aislamientos de LAB y NSLAB seleccionados así como la cepa biopreservante de uso comercial *L. casei* BAL C fueron cultivados en matraces Erlenmeyer conteniendo caldo

MRS en las condiciones detalladas en la sección 3.6. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación fueron concentrados y filtrados como se indica en el apartado 3.6. Las placas se sembraron en superficie con 100 μ L de las cepas de *Clostridium* spp. a partir de caldo RCM crecido durante 16 horas y ajustado a Abs_{620 nm} igual a 0.05, equivalente a 10⁵ UFC/mL dadas las diferencias de crecimiento de dichas cepas. En cada disco se adicionaron 100 μ L de los sobrenadantes acondicionados. Las placas fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis estricta por 48 horas previo a su observación para determinar la presencia de halos. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Los datos obtenidos (diámetro de halos de inhibición) se analizaron por el método estadístico One-way ANOVA (p<0.05).

3.8 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos

Se estudiaron las cinéticas de crecimiento de los aislamientos de BAL productores de compuestos inhibitorios distintos a ácidos orgánicos y cuya acción inhibitoria fue similar a la cepa comercial *L. casei* BAL C. Asimismo la producción de los metabolitos anticlostridiales fue analizada periódicamente por 48 h.. Cada cepa fue crecida por 16 h. en caldo MRS, ajustada a Abs_{620 nm} igual a 0.47 (equivalente a 10⁸ UFC/mL) y sembrada en siete matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo MRS correspondientes a las horas 0, 3, 5, 9, 14, 24 y 48 en las cuales se realizaron diluciones seriadas decimales en tubos con 9 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) y 100 μ L fueron inoculados en superficie en placas de agar MRS. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas en microaerofilia en Jarra de GasPak (Atmosphere Generation System, 2.5 L AnaeroJar, Oxoid). También se midió el pH durante la cinética de crecimiento para determinar la actividad acidificante de los aislamientos a las horas ya indicadas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La producción de los compuestos antimicrobianos fue evaluada mediante la técnica de difusión en discos en agar RCM. Los cultivos líquidos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 15 min. a 4 °C, los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a pH 6.5 con NaOH 1M, se concentraron por rotaevaporación a 10X y fueron filtrados (0.22 μ m). La cepa *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 se empleó como microorganismo de referencia indicador de inhibición siguiendo el procedimiento detallado en el ítem 3.4.2. En cada disco se adicionaron 100 μ L de los respectivos sobrenadantes. Luego de incubar las placas a 37 °C por 48 horas en anaerobiosis estricta se analizó la presencia de inhibición por el diámetro de los halos.

3.9 Purificación y caracterización de compuestos anticlostridiales

Para las cepas de LAB y NSLAB que presentaron posible acción bacteriocinogénica se purificaron y caracterizaron los compuestos inhibitorios. Los aislamientos fueron crecidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo MRS durante 48 horas a 37 °C. Se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación a 10000 rpm durante 15 min. a 4 °C que fueron ajustados a pH 6.5 con NaOH 1M y sometidos a una precipitación con acetona (Pal et al., 2010). En vaso de Bohemia se adicionó 5 volúmenes de acetona fría por 1 volumen de sobrenadante bajo agitación constante en frío, para favorecer la precipitación los vasos de bohemia se mantuvieron a -20 °C toda la noche y la acetona fue descartada. La acetona residual se eliminó por evaporación a 37 °C y rotaevaporación

del precipitado resuspendido en agua destilada a 70 °C en agitación a 240 rpm hasta concentrar el extracto crudo 10X aproximadamente. Los extractos crudos resultantes fueron esterilizados con filtros de 0.22 µm y la actividad antimicrobiana de éstos se verificó por la técnica de difusión en placa de agar RCM contra la cepa *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 como se explicó anteriormente. El mismo procedimiento se realizó para obtener el extracto crudo a partir de la cepa BAL C cultivada en caldo MRS.

Todos los extractos crudos se sometieron a HPLC de fase reversa en un equipo LC-20A Shimadzu, inyectando 20 µL en una columna C18 y empleando un gradiente de elución con dos fases móviles, denominadas solución A y solución B cuyas composiciones se detallan a continuación:

Solución A:

- 5% acetonitrilo
- 0.1% ácido trifluoroacético
- 95% agua

Solución B:

- 0.1% ácido trifluoroacético
- 100% acetonitrilo

El programa de elución consistió en una etapa inicial de 5 min con solución A 100%, luego un gradiente hasta los 30 min. en que la solución A pasó de 100% a 0% y la solución B de 0% a 100% y un último paso en que la solución B se mantuvo al 100%. La elución se realizó a un flujo de 1mL/min y fue monitoreada mediante un detector UV a 220nm (Lü et al., 2014). Para identificar los picos pertenecientes a los potenciales compuestos peptídicos el cromatograma obtenido se comparó con el correspondiente al caldo MRS que fue empleado como blanco. La corrida cromatográfica se repitió tres veces para poder coleccionar volumen suficiente de las fracciones de interés que fueron concentradas 10X mediante rotaevaporación a 70 °C en agitación a 240 rpm.

La actividad anticlostridial de las fracciones eluidas mediante HPLC de fase reversa fue determinada por el método de difusión en agar con *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 como microorganismo indicador de inhibición en placa de agar RCM, inoculando por disco 90 µL de cada fracción. Los halos generados se compararon con los producidos por la fracción eluida correspondiente a la cepa de referencia BAL C y una solución de nisina (2.5 x10⁻³ mg/mL) empleada como control positivo de inhibición. La concentración de nisina considerada en el estudio fue previamente determinada mediante evaluación de la sensibilidad de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 a la nisina como se detalla en el ítem 3.10.

Las fracciones correspondientes a los picos con actividad inhibitoria fueron sometidas a espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en UBYPA, Instituto Pasteur de Montevideo, para determinar el peso molecular y obtener información estructural de los compuestos presentes empleando la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

3.10 Evaluación de la sensibilidad de *C. tyrobutyricum* a la nisina

La sensibilidad de *C. tyrobutyricum* a la nisina fue evaluada por la técnica de difusión en agar RCM. Cada placa se sembró en superficie con 100 µL de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 crecido en caldo RCM durante 16 horas y ajustado Abs_{620 nm} igual a 0.05 equivalente a 10⁵ UFC/mL. En los discos se inocularon 100 µL de soluciones de nisina a

las concentraciones: 2.5×10^{-2} , 2.5×10^{-3} y 2.5×10^{-4} mg/mL. Estas concentraciones se basan en estudios previos de la inhibición de *Clostridium* spp. por la nisina (Wijnker et al., 2011; Hofstetter et al., 2013; Liu et al., 2013; Garde et al., 2014) y en la concentración de nisina permitida en queso que es 12.5 mg/Kg de queso lo que equivale aproximadamente a 1.25 mg/L de leche (Ávila et al., 2014; Gharsallaouri et al., 2015; Müller-Auffermann et al., 2015; Alfaro y Chang, 2017). Las placas fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis estricta establecida con el sistema Anoxomat, al cabo de 24 o 48 horas se evaluaron los halos de inhibición desarrollados alrededor de los discos.

3.11 Determinación de la sensibilidad de cepas LAB y NSLAB a la lisozima

Se estudió la sensibilidad de los aislamientos de LAB y NSLAB seleccionados a la lisozima para determinar la compatibilidad de éstas con los niveles de lisozima empleados en la industria quesera. Tubos con 9 mL de caldo MRS fueron adicionados con lisozima a concentración final de 1 mg/mL y se realizaron diluciones seriadas decimales en tubos con igual volumen del medio de cultivo. Cada cepa a evaluar se inoculó por duplicado al 1% en los tubos a partir de un cultivo previo en caldo MRS con 7 horas de crecimiento a 37 °C y fueron incubados durante 24 horas a igual temperatura. Para cada cepa se realizó un control positivo de crecimiento bacteriano que consistió en un tubo con 9 mL de caldo MRS sin lisozima agregada inoculado e incubado de la forma ya descrita. Para determinar la viabilidad bacteriana luego del tratamiento con lisozima, se inocularon en superficie placas de agar MRS con 20 µL de cada tubo y fueron incubadas a 37 °C por 24 horas en microaerofilia (Neviani et al., 1991; Dias et al., 2015).

La sensibilidad de los aislamientos también se evaluó a concentraciones de 1.88, 3.00, 3.75, 7.50 y 15.00 mg/mL de lisozima en placas de agar MRS por el método de difusión en agar como se describe a continuación. Cada una de las cepas seleccionadas fue inoculada en caldo MRS e incubada por 7 horas en microaerofilia a 37 °C. Se realizaron diluciones seriadas decimales a partir de los cultivos puros en tubos con 9 mL de solución salina fisiológica (0.85% NaCl) y fueron sembradas por duplicado en superficie en placas de agar MRS. En los discos se sembraron 100 µL de las soluciones de lisozima previamente preparadas con buffer sodio fosfato (10 mM, pH 7.0) a las concentraciones indicadas. Las placas fueron observadas luego de ser incubadas a 37 °C durante 24 horas en microaerofilia para determinar la presencia de halos.

3.12 Evaluación de la acción anticlostridial de la lisozima.

Se evaluó la acción inhibitoria de la lisozima sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 a diferentes concentraciones finales: 1.50, 1.00, 0.50, 0.10 y 0.05 mg/mL mediante el método de difusión en agar RCM. Previamente, la cepa fue crecida en caldo RCM durante 16 horas, ajustada a 10^5 UFC/mL por absorbancia a 620 nm ($Abs_{620 \text{ nm}} = 0.05$). Las soluciones de lisozima se prepararon en buffer sodio fosfato (10 mM, pH 7.0) a las concentraciones indicadas. En los discos se adicionaron 100 µL de cada solución preparada. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis estricta realizada en un equipo Anoxomat, y se midieron los halos de inhibición.

3.13 Comparación de la acción anticlostridial de los sobrenadantes de las cepas LAB y NSLAB respecto a la lisozima y en combinación con ésta.

El método de difusión en agar RCM con discos se realizó con el fin de comparar la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de las cepas LAB y NSLAB seleccionadas con la presentada por lisozima, la combinación de lisozima con los sobrenadantes y la desarrollada por el sobrenadante de la cepa de uso comercial *L. casei* BAL C. Las placas fueron inoculadas en superficie con 100 µL de un cultivo de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 crecido en caldo por 16 h. y ajustado a 10^5 UFC/mL por absorbancia a 620 nm. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ítem 3.12 se establecieron las condiciones para el desarrollo de este punto. En los discos se añadieron 100 µL de cada uno de los siguientes tratamientos: sobrenadante obtenido a partir de la cepa cultivada en caldo MRS como se describió en el ítem 3.6, solución de lisozima a concentración 0.75 mg/mL preparada con buffer sodio fosfato (10 mM, pH 7.0), mezcla 1:1 del sobrenadante de la cepa productora y solución 1.5 mg/mL de lisozima (0.75 mg/mL de lisozima en la mezcla resultante) y sobrenadante de la cepa biopreservante de uso comercial *L. casei* BAL C. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis estricta y los halos de inhibición generados fueron medidos. Los datos obtenidos se analizaron por el método estadístico One-way ANOVA ($p < 0.05$).

4. Resultados y discusión

Se realizaron seis muestreos bimensuales en diez queserías artesanales, en los cuales se colectaron un total de 180 muestras: 60 de leche cruda, 60 de suero lácteo y 60 de quesos. A partir de las muestras procesadas se aislaron 130 cepas de bacterias ácido lácticas LAB y NSLAB. Asimismo, se determinó el NMP de esporulados anaerobios presentes en cada muestra.

4.1 Determinación del NMP de esporas

La determinación del NMP permitió verificar que los recuentos de esporulados anaerobios presentes en las muestras analizadas de leche, queso y suero lácteo fueran bajos. En las muestras de leche la carga máxima registrada de esporas clostridiales fue 3.6×10^2 esporas/L, ubicándose por debajo del umbral considerado crítico en la mayoría de los trabajos científicos (1.0×10^3 esporas/L de leche) para la ocurrencia de hinchazón tardía (Arias et al., 2013; Garde et al., 2013).

En queso el máximo recuento registrado fue 9.2×10^3 esporas/g. Los recuentos de esporas clostridiales asociados a quesos con hinchazón tardía presentados por otros autores (Dasgupta y Hull, 1989; Le Bourhis et al., 2005; Garde et al., 2011; Ivy y Wiedmann, 2014; Bermúdez et al., 2016) se encuentran en el rango de 10^1 a 10^7 esporas/g dependiendo del tipo de queso. La gran variación encontrada en la literatura científica refleja que la aparición de hinchazón tardía depende de la carga de esporulados anaerobios existente, pero también de los parámetros fisicoquímicos de los quesos producidos y las condiciones de elaboración que pueden favorecer o dificultar la proliferación de *Clostridium* spp.. Asimismo la presencia de “biofilms”, las condiciones higiénicas y los procesos de sanitización a nivel de la planta quesera, son otros aspectos importantes a considerar. Además las especies causantes de este defecto difieren en su capacidad de generar la alteración (LeBourhis, 2007; Arias, 2013; Garde et al., 2013). Con respecto a las muestras de suero lácteo la carga más alta de esporas clostridiales fue 7.4×10^3 esporas/L.

4.2 Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial

A partir de las 130 cepas puras de LAB y NSLAB aisladas, 56 presentaron actividad inhibitoria sobre *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 por el método de confrontación por estrías (Fig. 14). En la Tabla 6 se informa el número total de aislamientos de BAL obtenidos por muestra de leche, queso y suero lácteo, detallando el número de cepas con actividad inhibitoria. Las mismas fueron evaluadas por los métodos de difusión en agar y de la doble capa de agar para seleccionar las cepas con mayor acción anticlostridial.

Tabla 6: Total de cepas de LAB y NSLAB provenientes de leche, queso y suero lácteo. Para cada tipo de muestra se indica el número de aislamientos que presentaron actividad anticlostridial en el método de confrontación de estrías.

Fuente de aislamiento	Aislamientos	Aislamientos con actividad inhibitoria
Leche	41	17
Queso	63	29
Suero lácteo	26	10
No. total de aislamientos:	130	56

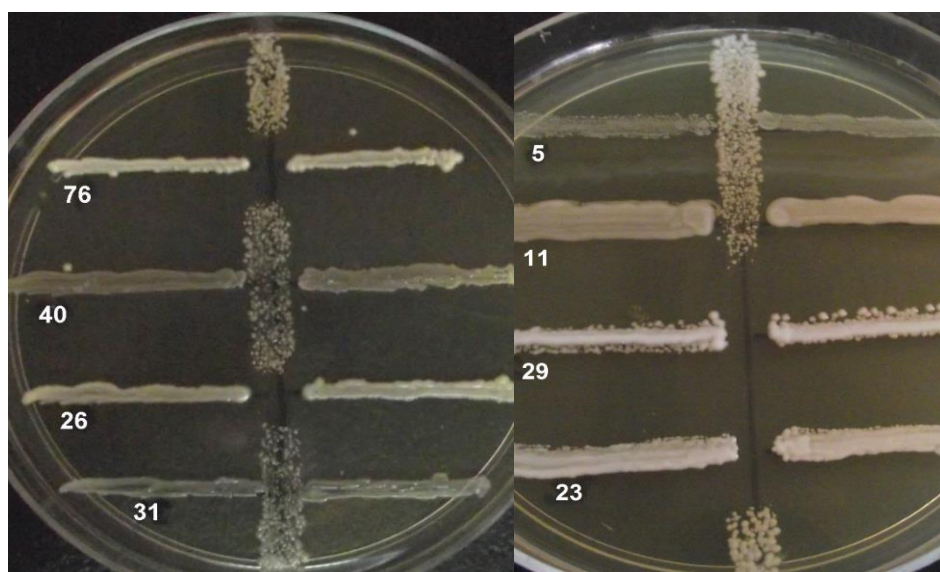


Figura 14: Método de confrontación de estrías en agar RCM. Los números corresponden a aislamientos de BAL evaluados frente a *C. tyrobutyricum* ATCC 25755.

El método de difusión en agar fue empleado para seleccionar en forma cualitativa las cepas de BAL con mayor actividad anticlostridial, por el elevado número de aislamientos a estudiar, así como por la rapidez y relativa simplicidad del método. Por estas razones dicha técnica sigue siendo una de las más empleadas para evaluar la capacidad inhibitoria de sobrenadantes, extractos crudos y compuestos antimicrobianos purificados de origen microbiano. En este método la actividad antimicrobiana se correlaciona con el diámetro de los halos inhibitorios generados, aunque existen varios factores que afectan la difusión de los compuestos bioactivos, por ejemplo: composición y pH del medio de cultivo en el que se realiza el ensayo, grosor del agar, concentración del metabolito

inhibitorio y tipo de solvente en que éste se encuentra, pH de la solución antimicrobiana, volumen de la solución sembrada en el disco, concentración del microorganismo indicador de inhibición, así como el tiempo y las condiciones de incubación de las placas (temperatura y composición atmosférica) (Ortez, 2005; Kalchinov et al., 2009; Lalpuria et al., 2012; Panda, 2012; Liu et al., 2016; Christenson et al., 2018).

Por todo lo anterior, se establece un gradiente de difusión y concentración del metabolito antimicrobiano desde el disco a la periferia y por lo tanto de la actividad antimicrobiana producida. En consecuencia, el método de difusión en agar es cuantitativamente poco preciso en comparación con otros métodos, por ejemplo, el de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en caldo o agar. Debido a esto, la técnica de difusión es más adecuada para diferenciar a las cepas evaluadas en tres categorías: susceptible, intermedia y resistente, según el tamaño de halo de inhibición que presentan. Cabe mencionar que en la mayoría de las combinaciones de microorganismos y compuestos inhibitorios existe correlación entre el diámetro de los halos de inhibición generados y los valores de MIC determinados (Panda, 2012; CLSI M100 S-25, 2015; Brown et al., 2016; Liu et al., 2016).

Si bien el método de difusión en agar carece de precisión para evaluar cuantitativamente la acción inhibitoria existente; en esta investigación dicha técnica se empleó para comparar los halos de inhibición producidos por sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos bacterianos en caldo MRS incubados en idénticas condiciones y purificados de igual forma, por lo cual las variables que afectan los halos de inhibición producidos deberían incidir de forma similar en todas las muestras evaluadas en un mismo ensayo.

La Figura 15 corresponde a la técnica de difusión realizada en placas de agar RCM para cuatro de las cepas seleccionadas en la etapa anterior y la cepa de referencia. Los aislamientos evaluados mediante este método fueron agrupados de acuerdo al diámetro de sus halos de inhibición (Tabla 7).

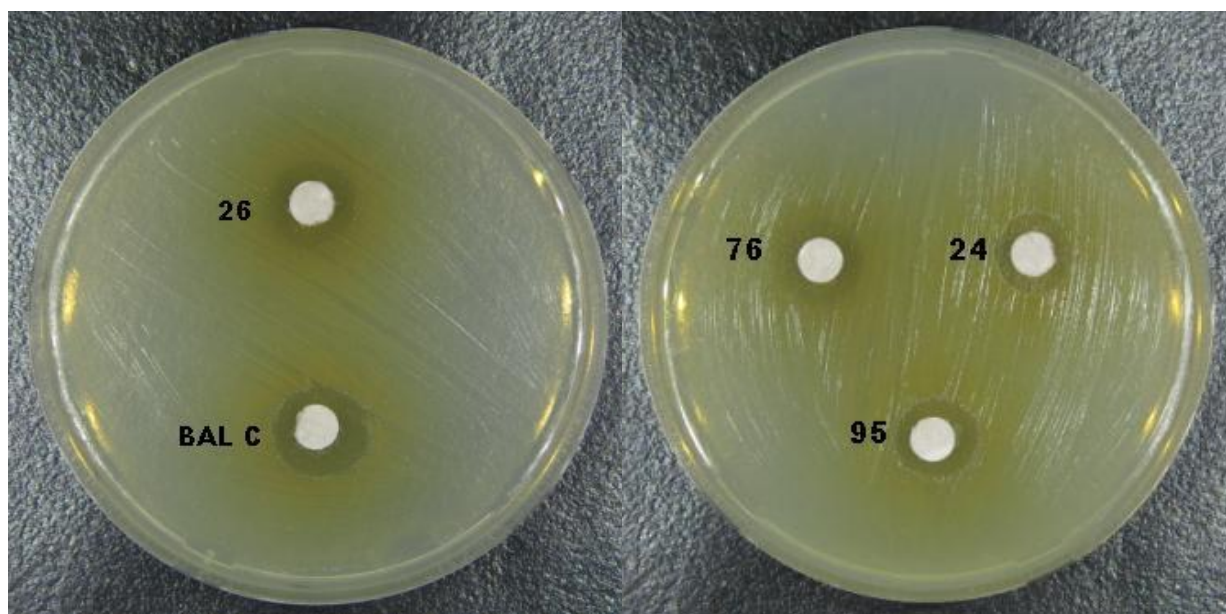


Figura 15: Método de difusión en agar RCM. En las fotos se observan los halos de inhibición correspondientes a los sobrenadantes de las cepas 24, 26, 76, 95 y BAL C (control de inhibición) sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755.

Tabla 7: Aislamientos agrupados según el diámetro de sus halos de inhibición. Criterio de clasificación: (+++) halo ≥ 1.2 cm correspondiente a la cepa anticlostridial BAL C; (++) halo entre 1.2 - 0.8 cm; (+) halo ≤ 0.8 cm; (-) ausencia de halo de inhibición. Dentro de cada categoría las cepas están ordenadas en orden decreciente de inhibición.

Halo de inhibición	Aislamientos agrupados	No. total de aislamientos
+++	26, 104, 95, 29, 23, 76, 24, 114, 83	9
++	7, 126, 34, 125, 13, 101, 3, 108, 9, 107, 77, 2, 100, 61, 116, 42, 110, 1, 121, 122, 60	21
+	11, 109, 105, 97, 35, 62, 50, 17, 111, 51, 86, 15, 79, 58, 94, 55, 18, 36, 57	19
-	52, 59, 119, 27, 32, 33, 49	7

En la Figura 16 se graficó el diámetro de los halos de inhibición de las 16 cepas con mayor acción anticlostridial ordenadas de acuerdo a este parámetro. En base al análisis estadístico realizado a los datos obtenidos, se determinó que cuatro cepas (125, 13, 101 y 3) presentaron actividad inhibitoria significativamente menor ($p < 0.05$) a la generada por *L. casei* BAL C. Las mismas no fueron consideradas en las posteriores etapas de la investigación.

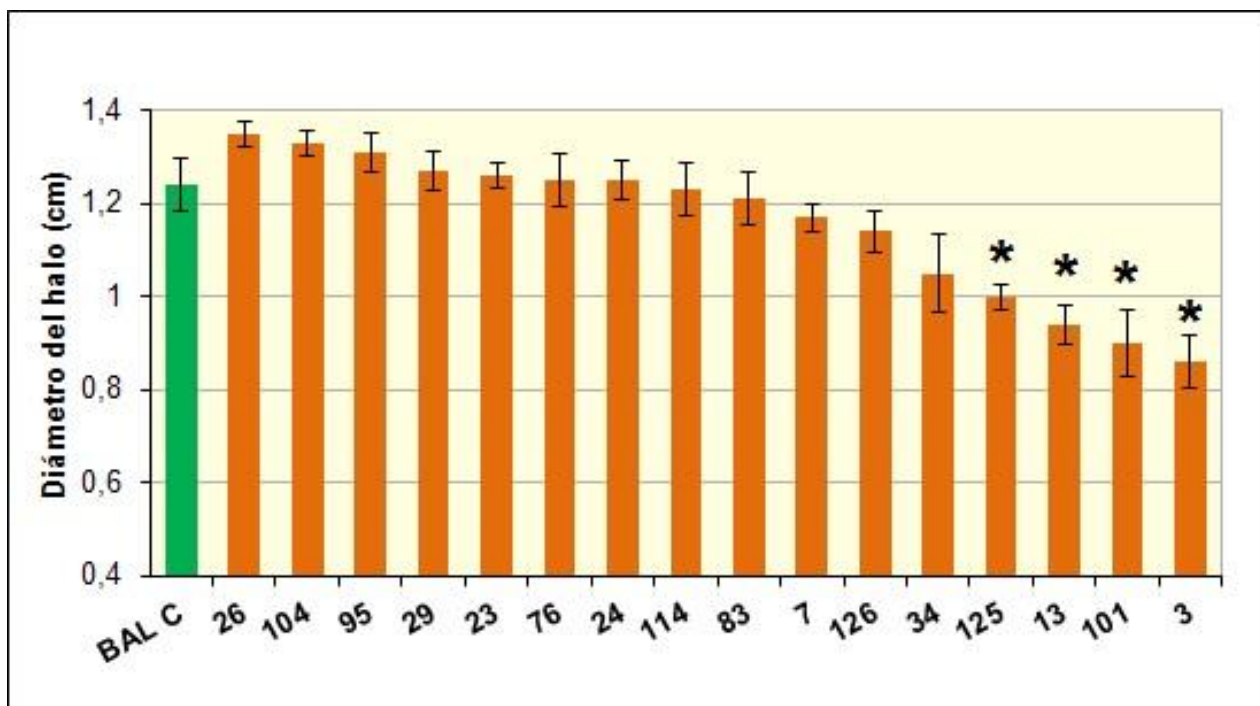


Figura 16: Gráfica del diámetro de los halos inhibitorios producidos por: BAL C (verde) y las cepas BAL evaluadas (naranja) por el método de difusión en agar. Los asteriscos indican los aislamientos cuyos halos de inhibición fueron significativamente menores al generado por la cepa BAL C ($p < 0.05$).

La actividad anticlostridial de los 16 aislamientos contra la cepa de *Clostridium* de referencia también fue analizada por el método de la doble capa de agar. En la Figura 17 se observa un ejemplo de inhibición de la cepa de *C. tyrobutyricum* de referencia por una cepa de BAL (104). De la misma manera se evaluaron los restantes aislamientos de BAL con actividad inhibitoria contra la cepa de *Clostridium* de referencia.



Figura 17: Método de la doble capa de agar. A la izquierda: placa correspondiente al ensayo de inhibición de la cepa 104 sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 crecido en la sobrecapa de agar. A la derecha: control negativo de inhibición (placa de agar MRS sin cepa BAL con la sobrecapa de agar del microorganismo indicador de inhibición).

Los datos obtenidos en este estudio, recuentos (UFC/mL) de *C. tyrobutyricum* en las sobrecapas de agar, fueron analizados (Fig. 18) comparándolos con la carga de esporulados anaerobios en leche que diversos investigadores asocian con la aparición de hinchazón tardía (10^3 UFC/mL) (Tůma et al., 2008; Ledenbach y Marshall, 2009; Kalač, 2011; Cosentino et al, 2013; D’Incecco et al., 2018). En base a este criterio las cepas de BAL que permitieron recuentos de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 iguales o mayores a la carga de referencia, no fueron incluidas en posteriores análisis.

En la placa control que no contenía cepa de BAL inhibitoria, el recuento de *C. tyrobutyricum* fue 10^6 UFC/mL. La presencia de BAL C en la doble capa afectó el crecimiento del *Clostridium* de referencia obteniéndose un recuento de $10^{2.6}$ UFC/mL. Con respecto a las 16 cepas de LAB y NSLAB evaluadas, siete de ellas disminuyeron los recuentos de *C. tyrobutyricum* de referencia por debajo de 10^3 UFC/mL. Lo anterior indica que la acción anticlostridial producida por estos aislamientos puede ser de interés para su uso en el control de esporas del microorganismo de referencia.



Figura 18: Recuentos bacterianos (UFC/mL) de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 obtenidos en las placas correspondientes al método de la doble capa de agar. En violeta recuento bacteriano en la placa control (placa sin cepa de BAL inhibitoria), en verde recuento en placa en presencia de BAL C, en naranja recuentos en placa en presencia de las cepas de BAL evaluadas. La línea punteada corresponde a la carga de esporulados anaerobios asociada a la aparición de hinchazón tardía.

En ambos métodos de análisis siete cepas presentaron la mayor actividad inhibitoria, las mismas fueron seleccionadas para determinar sus mecanismos de acción anticlostridial. En la Tabla 8 se indica la identidad de los siete aislamientos así como las fuentes de las cuales fueron obtenidos.

Tabla 8: Aislamientos LAB y NSLAB seleccionados por los métodos de difusión y doble capa de agar.			
Cepa	Identificación	Fuente	Tipo de BAL
29	<i>L. casei/paracasei</i>	queso	NSLAB
26	<i>L. casei</i>	queso	NSLAB
95	<i>L. casei</i>	Leche cruda	NSLAB
23	<i>S. macedonicus</i>	queso	NSLAB
24	<i>S. macedonicus</i>	queso	NSLAB
104	<i>L. rhamnosus</i>	leche cruda	NSLAB
76	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	leche cruda	LAB

4.3 Identificación y diversidad genética de las cepas con actividad anticlostridial

Los aislamientos con actividad anticlostridial fueron identificados por secuenciación del gen del ARNr 16S determinando relaciones filogenéticas entre las cepas y por comparación con banco de datos (Anexo 1). Paralelamente, se utilizaron las técnicas de fingerprinting: BOX-PCR, (GTG)₅-PCR, RAPD-S1 y RAPD-S4 que permitieron comparar los perfiles de bandas obtenidos de las cepas aisladas con los pertenecientes a cepas LAB y NSLAB provenientes de leche y quesos que integran la colección de cepas disponibles en el laboratorio. La Figura 19 representa la predominancia de cada especie respecto al total de aislamientos con capacidad inhibitoria. Como se puede apreciar, el 66% de los aislamientos pertenecieron al denominado Grupo *Lactobacillus casei* que nuclea a las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, siguiendo en orden de predominancia *L. delbrueckii*, *S. macedonicus* y *P. pentosaceus*.

El Grupo *L. casei* comprende una categoría taxonómica debido al elevado grado de similitud fenotípica y alta proximidad filogenética que existe entre las especies que lo componen. De acuerdo a lo citado previamente es difícil discriminarlas mediante pruebas bioquímicas y técnicas de biología molecular como la secuenciación del gen del ARNr 16S. En consecuencia a lo descrito se emplearon técnicas de PCR-especie específicas para lograr asignar la identidad de especie a este grupo (Sato et al., 2012; Iacumin et al., 2015). En referencia a los resultados obtenidos, el 30.4% de los aislamientos del Grupo *L. casei* no se pudieron identificar a nivel de especie por secuenciación del gen del ARNr 16S por las causas antes explicadas. Mediante las técnicas de PCR-especie específicas se determinó que el 10.8% de los aislamientos no identificados correspondieron a *L. rhamnosus*. Para los restantes aislamientos (19.6%) no se pudo diferenciar entre *L. casei* y *L. paracasei* puesto que se obtuvo producto de amplificación empleando ambos pares de primers especie-específicos.

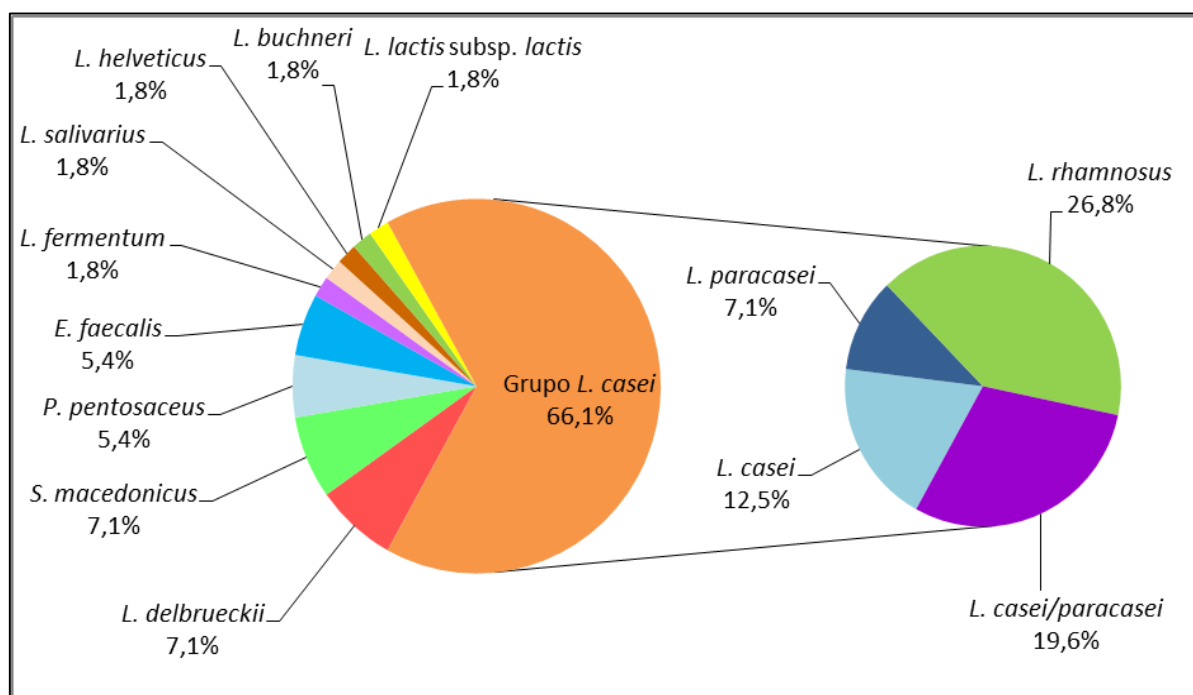
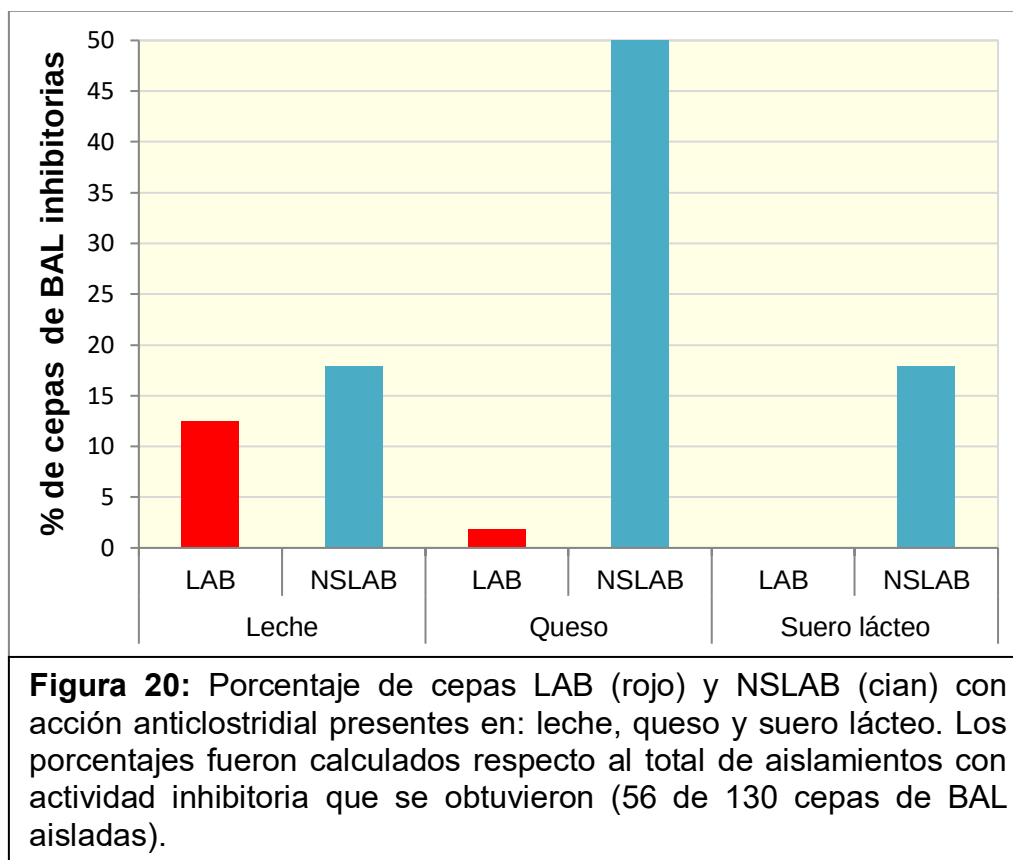


Figura 19: Predominio de cada especie respecto al total de aislamientos de BAL con actividad anticlostridial. En el mismo gráfico se indica la composición del Grupo *L. casei*.

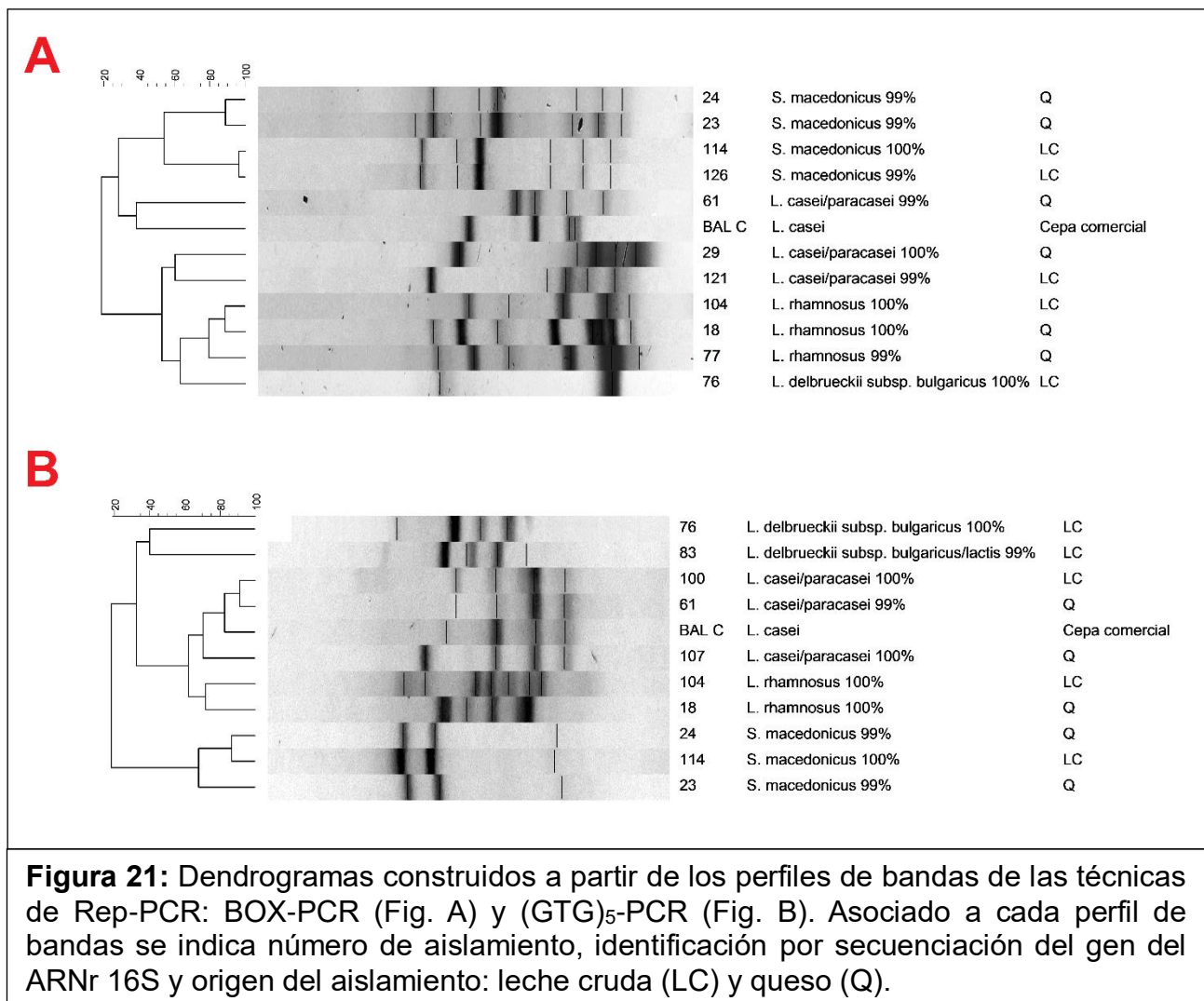
La identificación de los aislamientos con actividad inhibitoria a nivel de especie permitió diferenciarlos como cepas de LAB o NSLAB. La Tabla 9 informa el número de cepas de LAB y NSLAB con acción anticlostridial presentes en leche, queso y suero lácteo. De acuerdo con ésta, la mayoría de las cepas con capacidad inhibitoria aisladas fueron NSLAB. Asimismo, los quesos constituyeron el mayor reservorio para el aislamiento de cepas anticlostridiales. Estas observaciones se aprecian mejor en la Figura 20 que representa el porcentaje de cepas LAB y NSLAB con actividad inhibitoria aisladas en los tres tipos de muestras respecto al total de aislamientos inhibitorios obtenidos (ver Tabla 6).

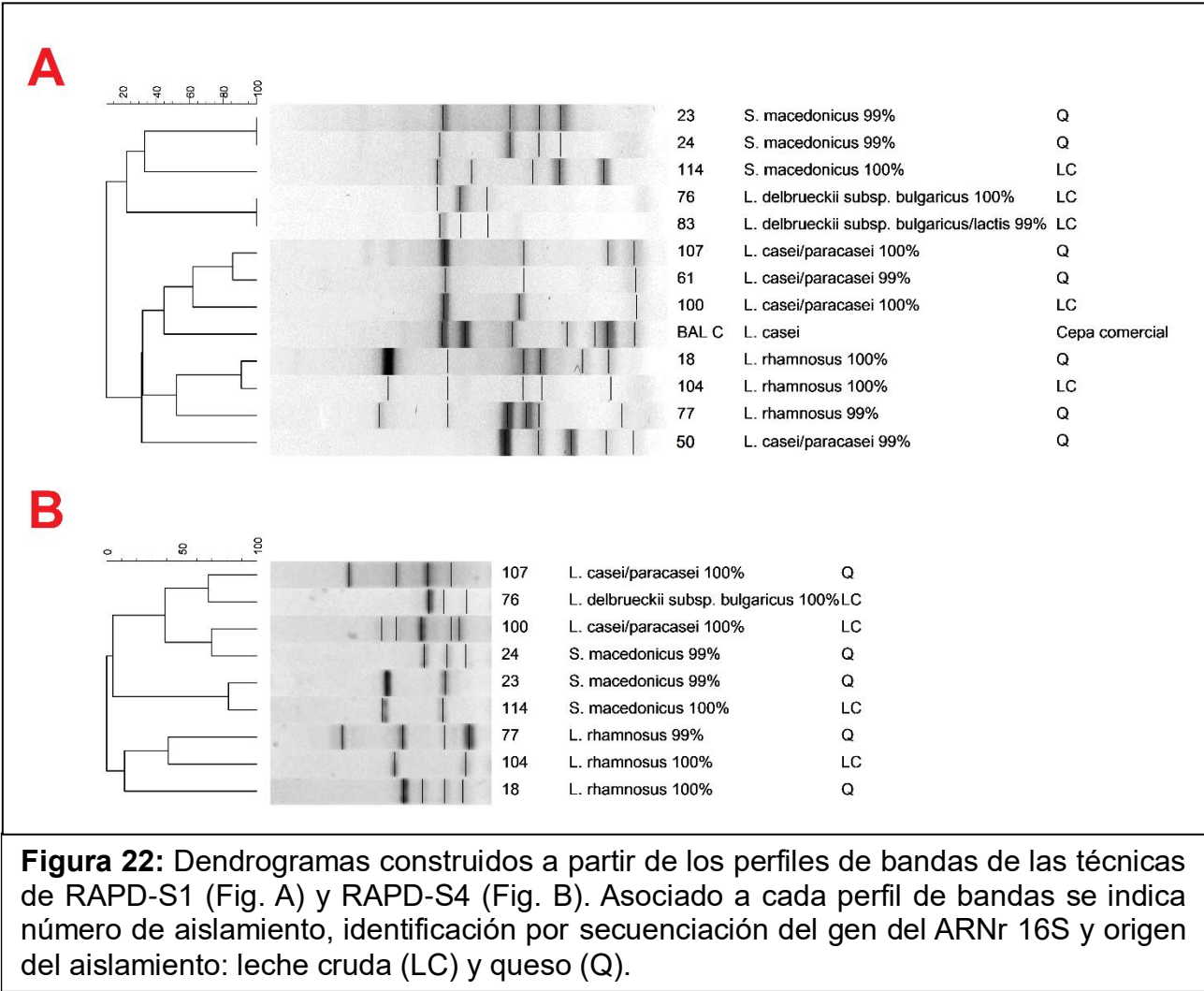
Tabla 9: Número de cepas de LAB y NSLAB con actividad anticlostridial aisladas en leche, queso y suero lácteo			
Especies de LAB aisladas	Leche	Queso	Suero lácteo
<i>Lactococcus lactis</i>	1	—	—
<i>Lactobacillus helveticus</i>	1	—	—
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3	1	—
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	—	—
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	—	—
Cantidad de cepas LAB por tipo de muestra	7	1	—
Total de cepas LAB aisladas	8		
Especies de NSLAB aisladas	Leche	Queso	Suero lácteo
<i>Lactobacillus casei</i>	1	4	2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	2	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2	8	5
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> *	2	7	2
<i>Lactobacillus buchneri</i>	—	1	—
<i>Streptococcus macedonicus</i>	1	3	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	2	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1	—
Cantidad de cepas NSLAB por tipo de muestra	10	28	10
Total de cepas NSLAB aisladas	48		
* no se pudieron diferenciar a nivel de especie con las técnicas de identificación molecular empleadas			



En referencia a la predominancia de cepas NSLAB inhibidoras de *Clostridium* en quesos, debe recordarse que éstos fueron muestreados al tercer mes de maduración, período en el cual las NSLAB se vuelven la microflora predominante, pero que también resulta favorable para el crecimiento de *Clostridium*. En consecuencia, ambos grupos bacterianos podrían competir por ciertos nutrientes. En estas condiciones, las cepas de NSLAB con actividad anticlostridial serían mejores competidoras que las carentes de dicha capacidad y por lo tanto tenderían a predominar en el queso respecto a estas últimas (Reis et al., 2012; Bermúdez et al., 2016; Reginensi et al., 2016; Soggiu et al., 2016).

Por otra parte, para las especies más abundantes: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* y *S. macedonicus* los perfiles de bandas obtenidos por las técnicas de fingerprinting fueron analizados con el Software Gel Compar Versión 4.1 mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el método UPGMA para determinar la similitud entre los patrones de bandas y construir dendrogramas de relaciones filogenéticas. Las Figuras 21 A y B corresponden a los dendrogramas construidos con los perfiles de bandas obtenidos por las técnicas de Rep-PCR: BOX-PCR y (GTG)₅-PCR respectivamente. Las Figuras 22 A y B son los dendrogramas pertenecientes a las técnicas de RAPD realizadas con los primers S1 y S4, respectivamente.





Con respecto a la diversidad genética de los aislamientos considerados, en los dendrogramas obtenidos se pudo apreciar que éstos difieren en su porcentaje de similitud a nivel intra-especie, tratándose posiblemente de cepas distintas. Cabe aclarar que si bien en el dendrograma construido con los perfiles de RAPD-S₁ los porcentajes de similitud entre *S. macedonicus* 23 y 24, así como entre *L. delbrueckii* 76 y 83 fueron del 100%, las restantes técnicas de fingerprinting detectaron diferencias a nivel de cepa. Los resultados obtenidos por RAPD-S₁ para las cepas mencionadas, podrían deberse a que los sitios de unión para el primer S₁ no presentan diferencias de secuencias y por lo tanto las cepas no pueden ser discriminadas mediante esta técnica. Otra cosa que se pudo determinar es que en los dendrogramas correspondientes a los perfiles de (GTG)₅-PCR (Fig. 21 B) las cepas quedaron agrupadas según su proximidad filogenética a nivel de especie, mientras que en los dendrogramas asociados a las otras técnicas de fingerprinting algunas cepas tuvieron mayor porcentaje de similitud con cepas de otros géneros y no con las pertenecientes a otras especies con mayor relación filogenética.

En el dendrograma de BOX-PCR (Fig. 21 A) los perfiles de las cepas *L. casei* BAL C y *L. casei/paracasei* 61 se encuentran agrupados con los de *S. macedonicus* en vez de los patrones de bandas de las cepas de *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, como ya se indicó estas tres especies son genéticamente muy cercanas y por lo tanto tendrían que

estar agrupadas juntas. Asimismo los bandeos obtenidos para los aislamientos 104, 18 y 77 de *L. rhamnosus* presentaron mayor similitud con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 que con las otras cepas del Grupo *L. casei*.

En el dendrograma construido con los perfiles de RAPD-S1 (Fig. 22 A), los perfiles correspondientes a las cepas 76 y 83 de *L. delbrueckii* presentaron mayor porcentaje de similitud con los pertenecientes a los aislamientos de *S. macedonicus* que con las otras especies de *Lactobacillus* consideradas. Además *L. casei/paracasei* (50) se agrupó con los perfiles de *L. rhamnosus* y no con los asociados a los otros aislamientos de *L. casei/paracasei*, lo que podría deberse a que estas cepas difieren respecto a *L. casei/paracasei* (50) en uno o más sitios de unión del primer S1 obteniéndose bandeos muy distintos. Por otra parte, en el dendrograma obtenido con los patrones de bandas de RADP-S4 (Fig. 22 B), las cepas de *L. casei/paracasei* (100 y 107), así como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (76) tuvieron menor similitud con los aislamientos de *L. rhamnosus* que los pertenecientes a *S. macedonicus*. De acuerdo a todo lo anterior, la técnica de fingerprinting (GTG)₅-PCR fue la más precisa para evaluar la diversidad genotípica de los aislamientos considerados.

4.4 Determinación de los mecanismos de acción inhibitoria

Los sobrenadantes obtenidos de las cepas seleccionadas fueron evaluados por el método de difusión en agar RCM para identificar los mecanismos responsables de inhibición. En el caso de los aislamientos *S. macedonicus* 23, *S. macedonicus* 24, *L. casei/paracasei* 29 y *L. rhamnosus* 104 se determinó que la actividad inhibitoria se debía a la producción de acidez, porque como se puede apreciar en la Figura 23 los sobrenadantes una vez neutralizados no presentaron halo de inhibición. Es importante indicar que la producción de ácidos orgánicos como único mecanismo de acción anticlostridial no sería adecuada para el control del crecimiento de *Clostridium* spp. en quesos duros y semiduros porque el pH más bajo que suelen alcanzar durante su producción se encuentra en el rango de 5.2 a 5.5, mientras que la inhibición de *Clostridium* spp. requiere valores de pH ≤ 4.0 (Watkinson et al., 2001; Drouin y Lafrenière, 2012; Ghoddusi et al., 2013; Ivy y Wiedmann, 2014; Fox, 2017).

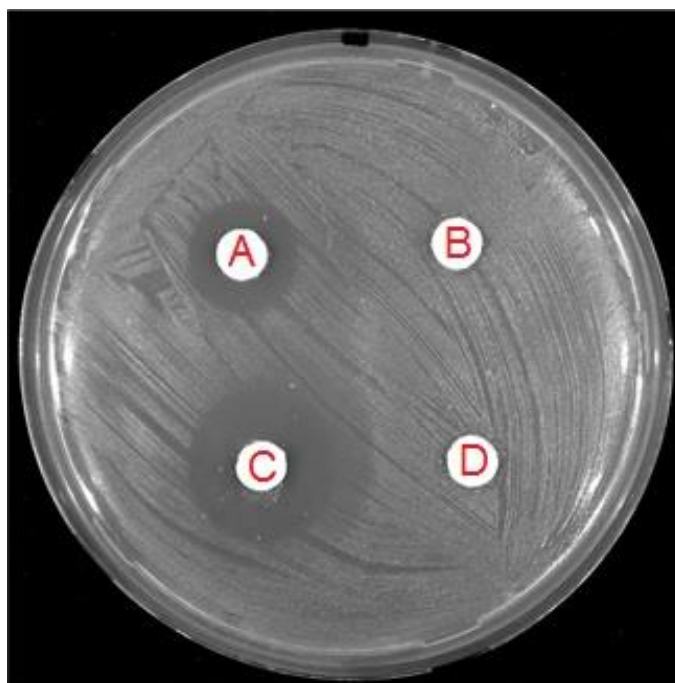


Figura 23: Cepas de BAL con acción anticlostridial causada solamente por acidez. Se muestran: SN sin neutralizar (A) y neutralizado (B) de *S. macedonicus* 24, así como SN sin neutralizar (C) y neutralizado (D) de *L. casei/paracasei* 29.

Es importante notar que el pH al que se encuentra el sobrenadante influye en la estabilidad y actividad de otros compuestos antibacterianos como el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. Para este tipo de compuestos la neutralización del pH puede reducir su actividad inhibitoria disminuyendo la detección de los mismos. En consecuencia la inhibición detectada en los sobrenadantes neutralizados podría ser una subvaloración de la que realmente estos metabolitos generan. En el caso del peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas presenta mayor actividad inhibitoria, además los ácidos

orgánicos presentes establecen un sinergismo con este compuesto (Luján, 2010; Martin y Maris, 2012b; Leggett et al., 2015). Se debe señalar que la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son capaces de producir peróxido de hidrógeno mediante oxidación de lactato (Reis et al., 2012).

Con respecto a las bacteriocinas de manera general son estables a pH ácidos o próximo a la neutralidad pero no en condiciones alcalinas, debido a esto las bacteriocinas son compatibles con el metabolismo acidificante de las cepas de BAL bacteriocinogénicas (Li et al., 2015a; Rascón, 2016). Otro aspecto a considerar es que las bacteriocinas sufren un proceso de adsorción-desorción a la célula productora que es dependiente del pH del medio, cuando el pH es cercano a 6.0 las bacteriocinas tienden a asociarse a la membrana celular de la bacteria productora, mientras que a pH próximo a 2.0 estos compuestos tienden a liberarse. Esto es importante porque el pH de los sobrenadantes debe ser ajustado a valores próximos a 7.0 con el fin de detectar actividad inhibitoria por compuestos distintos a ácidos orgánicos. Dicho ajuste en el caso de cepas bacteriocinogénicas favorece la adsorción de las bacteriocinas a las células bacterianas y por lo tanto que exista menor concentración de éstas en el sobrenadante. En consecuencia, se puede subestimar la capacidad bacteriocinogénica de las cepas evaluadas (Tulini y De Martinis, 2010; Dündar et al., 2014). Por otra parte, la actividad bacteriocinogénica detectada también puede ser sobreestimada si las bacteriocinas establecen sinergismo con otros compuestos inhibitorios presentes (Šušćević et al., 2010; Noll et al., 2012).

Debido a todo lo anterior, los halos de inhibición generados en los ensayos de difusión en agar por los sobrenadantes neutralizados y tratados con catalasa y proteinasa K, no se pueden correlacionar cuantitativamente con la producción de peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, respectivamente. Los resultados obtenidos se deben interpretar en forma cualitativa.

En relación a los aislamientos *L. casei* 26, *L. casei* 95 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 así como la cepa anticlostridial comercial BAL C, los sobrenadantes separados y neutralizados mantuvieron la actividad inhibitoria presentando halos de menor diámetro respecto a los sobrenadantes sin neutralizar. De acuerdo a lo anterior estos aislamientos ejercen su acción inhibitoria por producción de acidez y otros compuestos inhibitorios responsables de la actividad remanente, esto también fue evidenciado por la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos correspondientes a los sobrenadantes neutralizados y tratados enzimáticamente (proteinasa K y catalasa). Para poder evaluar el efecto de los tratamientos enzimáticos y determinar los mecanismos de acción de estos aislamientos, la distancia comprendida entre el borde de la zona de inhibición y el disco se expresó como porcentaje de actividad remanente respecto al presentado por el sobrenadante neutralizado sin adición de enzima (control positivo de inhibición), dichos datos se presentan en la Tabla 10. En las Figuras 24 a 26 se observa la actividad inhibitoria producida por los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 76 y 95 tratados con catalasa y proteinasa K. Asimismo se aprecia la actividad anticlostridial de los sobrenadantes de estas cepas luego de ser tratadas térmicamente a 70 y 100 °C durante 15 min..

Tabla 10: Actividad anticlostridial remanente (%) producida por los sobrenadantes (SN) neutralizados y tratados de las cepas BAL C, 26, 95 y 76 con respecto a sus controles positivos de inhibición (SN neutralizados sin tratamiento: 100% de actividad inhibitoria). Para cada control positivo se indica el radio del halo de inhibición (cm).

Tratamiento	<i>L. casei</i> BAL C	<i>L. casei</i> 26	<i>L. casei</i> 95	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76
SN neutralizado	0,49 cm	0,45 cm	0,57 cm	0,27 cm
SN + proteinasa K	12%	65%	81%	98%
SN + catalasa	71%	39%	28%	6%
SN (70 °C/15min)	98%	73%	97%	102%
SN (100 °C/15min)	74%	58%	94%	91%

En el caso de BAL C (Fig. 24) se pudo constatar que dicha cepa es bacteriocinogénica, porque la actividad remanente en el sobrenadante tratado con proteinasa K (Fig. 24 C) solo retuvo el 12% de la actividad original. Por otra parte, el tratamiento con catalasa (Fig. 24 B) redujo 29% la acción anticlostridial de BAL C por lo que la producción de peróxido de hidrógeno contribuiría al biocontrol ejercido por esta cepa. Con respecto a la estabilidad térmica de los metabolitos antibacterianos de BAL C, éstos mantuvieron el 97% de su capacidad inhibitoria luego del tratamiento a 70 °C (Fig. 24 D), mientras que a 100 °C conservaron el 74% de la misma (Fig. 24 E), en consecuencia serían compuestos termoestables.



Figura 24: Determinación del mecanismo de inhibición de BAL C. Las letras identifican los tratamientos sembrados en los discos. A: SN neutralizado (control positivo de inhibición), B: SN tratado con catalasa, C: SN tratado con proteinasa K, D: SN sometido a 70 °C por 15 min. y E: SN sometido a 100 °C por 15 min..

Para las cepas 26 y 95 (Fig. 25) la actividad anticlostridial remanente de los sobrenadantes tratados con catalasa (Fig. 25 B) fue 39% y 28% respectivamente, mientras que la presentada por los sobrenadantes adicionados con proteinasa K (Fig. 25 C) fue 65% y 81%. Según estos datos la acción anticlostridial de estos aislamientos ocurriría principalmente por peróxido de hidrógeno y en menor grado mediante compuestos de naturaleza peptídica. La elevada actividad inhibitoria residual de los sobrenadantes tratados con proteinasa K se podría deber, en parte, a la acción anticlostridial ejercida por el peróxido de hidrogeno. En este sentido hay que indicar que si bien la producción de peróxido de hidrógeno es considerada una característica frecuentemente presente en aislamientos de *Lactobacillus* spp. de origen vaginal y una excepción en *Lactobacillus* provenientes de otros nichos (Martín y Suárez, 2010), se han aislado cepas de este género productoras de peróxido de hidrógeno de muestras fecales de lactantes y de ciertos productos lácteos como yogur (Enitan et al., 2011; Davoodabadi et al., 2015).

Es importante mencionar que la generación de peróxido de hidrógeno está determinada por la disponibilidad de O₂ (De Vuyst y Vandamme, 1994; Rouse y van Sinderen, 2008). Dado el bajo contenido de O₂ en quesos semiduros y duros, sería válido cuestionarse si los niveles de peróxido de hidrógeno producidos por las cepas BAL en estos productos son los requeridos para inhibir el desarrollo de *Clostridium* spp.

En relación a la detección de compuestos inhibitorios de naturaleza peptídica, frecuentemente se emplea la proteinasa K por ser una proteasa de amplio espectro de acción (Li et al., 2015a). Sin embargo se han identificado bacteriocinas que son proteinasa-resistentes (Ouzari et al., 2008; Uğraş et al., 2014; Kaur y Kaur, 2015). Debido a esto la presencia de halo de inhibición alrededor de un sobrenadante tratado con proteinasa K puede deberse a que el compuesto antimicrobiano no es peptídico, o si lo es presenta resistencia a esta enzima. En base a todo lo anterior no se puede descartar la existencia de otros metabolitos inhibitorios no detectables por los ensayos aquí considerados.

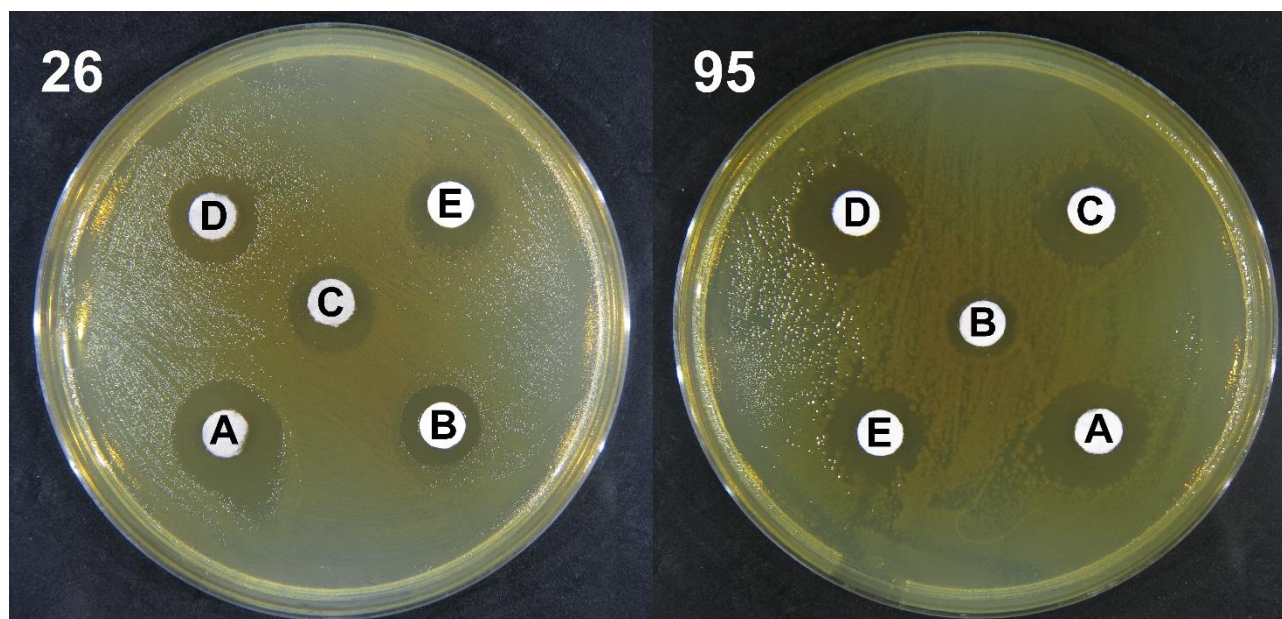


Figura 25: Placas correspondientes a la determinación de los mecanismos de inhibición de las cepas *L. casei* 26 (izquierda) y *L. casei* 95 (derecha). Las letras identifican los tratamientos sembrados en los discos. A: SN neutralizado (control positivo de inhibición), B: SN tratado con catalasa, C: SN tratado con proteinasa K, D: SN sometido a 70 °C por 15 min. y E: SN sometido a 100 °C por 15 min..

En referencia a los tratamientos térmicos (Fig. 25 D y E) de los sobrenadantes producidos por *L. casei* 26 y 95, se evidenció la presencia de uno o más compuestos anticlostridiales termoestables, especialmente en los sobrenadantes de la cepa 95 que retuvieron el 97 y el 94 % de la actividad inhibitoria luego de ser sometidos a 70 y 100 °C, respectivamente. Cabe indicar que los porcentajes de actividad remanente obtenidos para la cepa 95 son llamativos si se considera que el peróxido de hidrógeno, principal sustancia inhibitoria de acuerdo a los resultados obtenidos, incrementa su velocidad de descomposición aproximadamente 2,2 veces por cada 10 °C de aumento de temperatura en el rango de 20 a 100 °C (de la Macorra et al., 2004; Higuera y Tristancho, 2006; Solvay Chemicals, 2015). Por lo tanto la acción antimicrobiana residual en los sobrenadantes así tratados se debería a una bacteriocina y/o un compuesto de distinta naturaleza química termoestable en las condiciones evaluadas.

Con respecto a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 (Fig. 26) claramente se puede apreciar que no es una cepa bacteriocinogénica y que el control del desarrollo de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 se debe a la producción de peróxido de hidrógeno. Cabe indicar que la generación de peróxido de hidrógeno por cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ha sido frecuentemente reportada (Zalán et al., 2005; Adesokan et al., 2010; Hertzberger et al., 2014). Nuevamente la elevada conservación de la actividad anticlostridial en los sobrenadantes tratados térmicamente podría indicar la presencia de compuestos antagonistas de naturaleza no peptídica, lo que es reforzado por la existencia de actividad anticlostridial residual (6%) en el sobrenadante tratado con la enzima catalasa (Fig. 26 B).

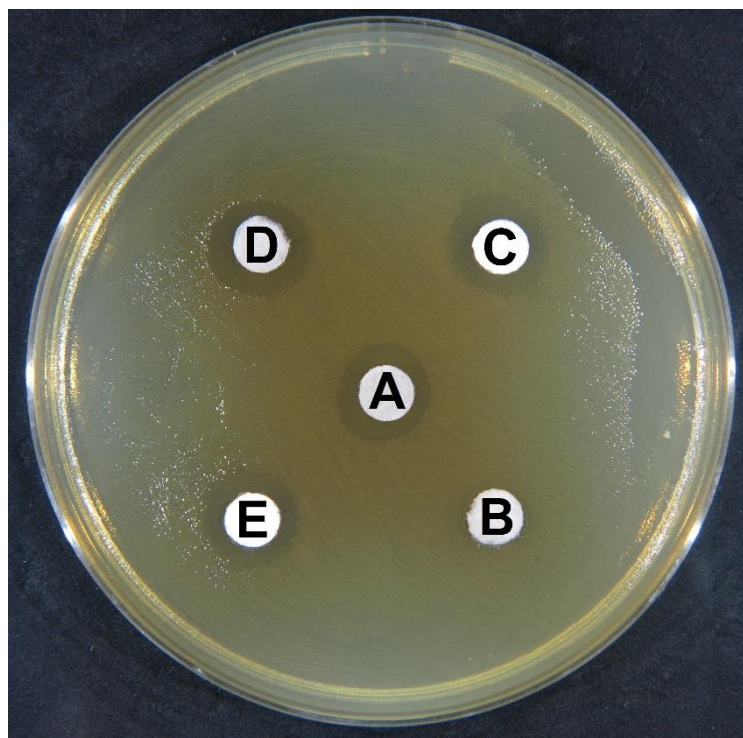


Figura 26: Determinación del mecanismo de inhibición de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76. En los discos se sembraron los tratamientos: A) SN neutralizado (control positivo de inhibición), B) SN tratado con catalasa, C) SN tratado con proteinasa K, D) SN sometido a 70 °C por 15 min. y E) SN sometido a 100 °C por 15 min..

Como se indica en la Tabla 10, para la cepa 76 se detectó mayor actividad anticlostridial remanente en el sobrenadante tratado a 70 °C (102%) que en el sobrenadante sin tratamiento térmico. Esto podría adjudicarse a variaciones en el diámetro del halo causadas por la baja reproducibilidad del ensayo que produjeron una sobre-estimación en el valor del porcentaje de actividad remanente. Otra posibilidad sería que el tratamiento térmico realizado haya inducido la reacción de Maillard, en la cual pueden formarse productos con actividad antimicrobiana. Varias investigaciones han constatado la acción inhibitoria de productos de la reacción de Maillard contra diferentes especies bacterianas, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Helicobacter pylori* (Hiramoto et al., 2004; Hauser et al., 2014; Garzón et al., 2017). Cabe recordar que en este trabajo los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos en caldo MRS que es rico en péptidos y proteínas y contiene glucosa, por lo cual es frecuente que el tratamiento térmico induzca la reacción mencionada (Menon et al., 2013; Woraprayote, 2014).

La Tabla 10 también permitió comparar la acción inhibitoria de los SN neutralizados de las cuatro cepas en estudio. Dicha actividad antimicrobiana se debe a metabolitos distintos a ácidos orgánicos. De esta forma se determinó que los compuestos producidos por *L. casei* 95 fueron los que lograron mayor acción inhibitoria sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755. Los correspondientes a BAL C y *L. casei* 26 presentaron niveles similares de

inhibición y generaron un control intermedio, mientras que la menor actividad inhibitoria correspondió a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76. Además al comparar la termoestabilidad de dichos compuestos, se pudo apreciar que los menos termosensibles fueron los producidos por la cepa 76 y en segundo lugar los sintetizados por BAL C, en cambio los metabolitos del aislamiento 26 resultaron los más afectados por los tratamientos térmicos. En la Tabla 11 se muestran los mecanismos de acción inhibitoria de las siete cepas comprendidas en el estudio contra la cepa de referencia de *C. tyrobutyricum*.

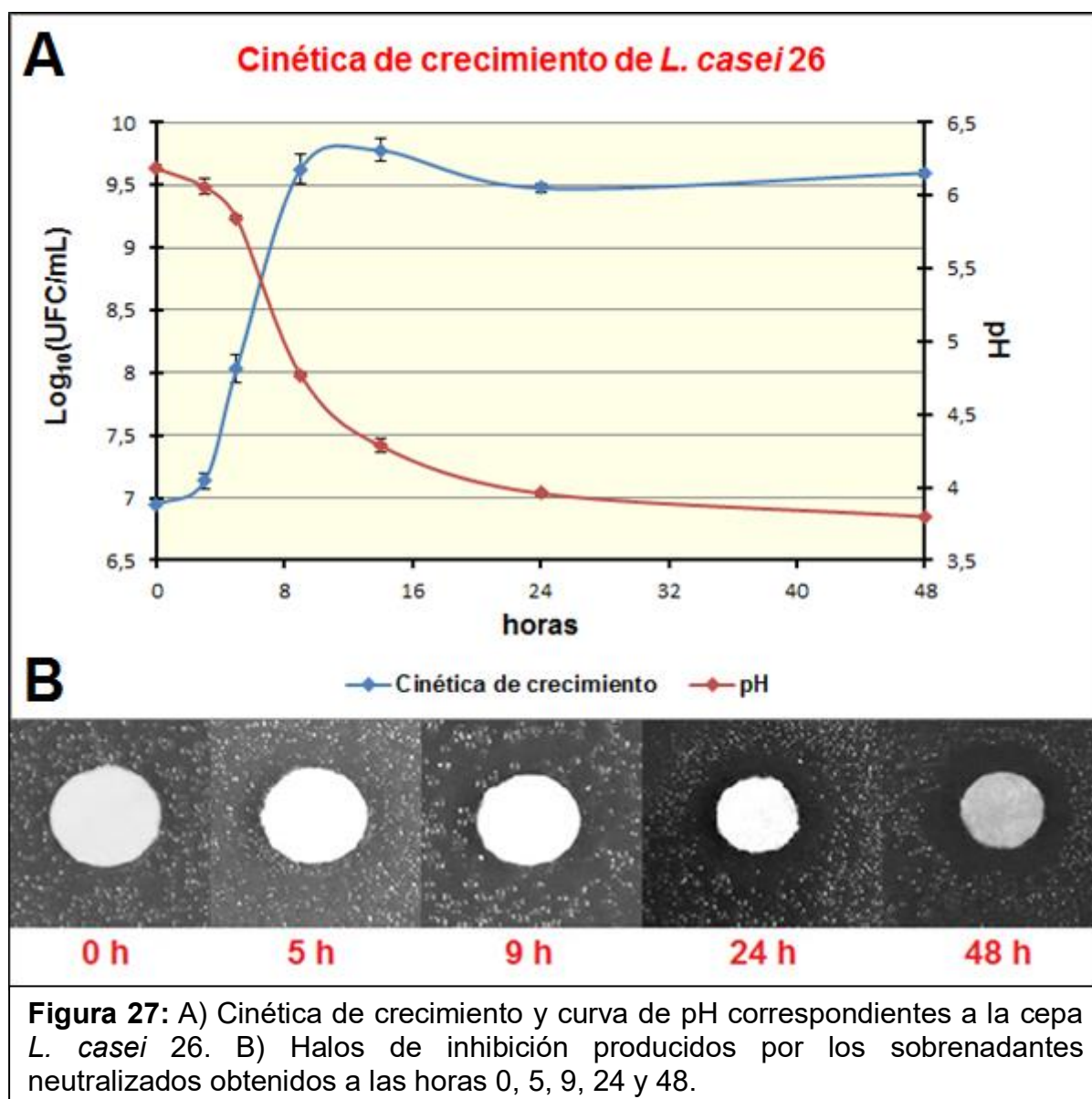
Tabla 11: Cuadro resumen de los mecanismos de inhibición detectados para las siete cepas en estudio contra la cepa de referencia de <i>C. tyrobutyricum</i> .		
Cepa	Fuente del aislamiento	Mecanismo de inhibición
<i>L. casei</i> BAL C	Cepa comercial	acidez, peróxido de hidrógeno, bacteriocina
<i>S. macedonicus</i> 23	Queso	acidez
<i>S. macedonicus</i> 24	Queso	acidez
<i>L. casei</i> 26	Queso	acidez, peróxido de hidrógeno, bacteriocina
<i>L. casei</i> 95	Leche cruda	acidez, peróxido de hidrógeno, bacteriocina
<i>L. casei/paracasei</i> 29	Queso	acidez
<i>L. rhamnosus</i> 104	Leche cruda	acidez
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 76	Leche cruda	acidez, peróxido de hidrógeno

4.5 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos

Las cinéticas de crecimiento de las cepas 26, 95 y 76 y la producción de compuestos antimicrobianos fueron estudiadas porque estos aislamientos producen sustancias inhibitorias diferentes a los ácidos orgánicos. También se determinaron los tiempos de duplicación bacteriana (T_D) y el pH desarrollado a lo largo del tiempo. Las Figuras 27 a 29 corresponden a las cinéticas de crecimiento de dichas cepas y los halos de inhibición obtenidos en los ensayos realizados de difusión en agar. La Tabla 12 muestra los tiempos de duplicación de las cepas evaluadas.

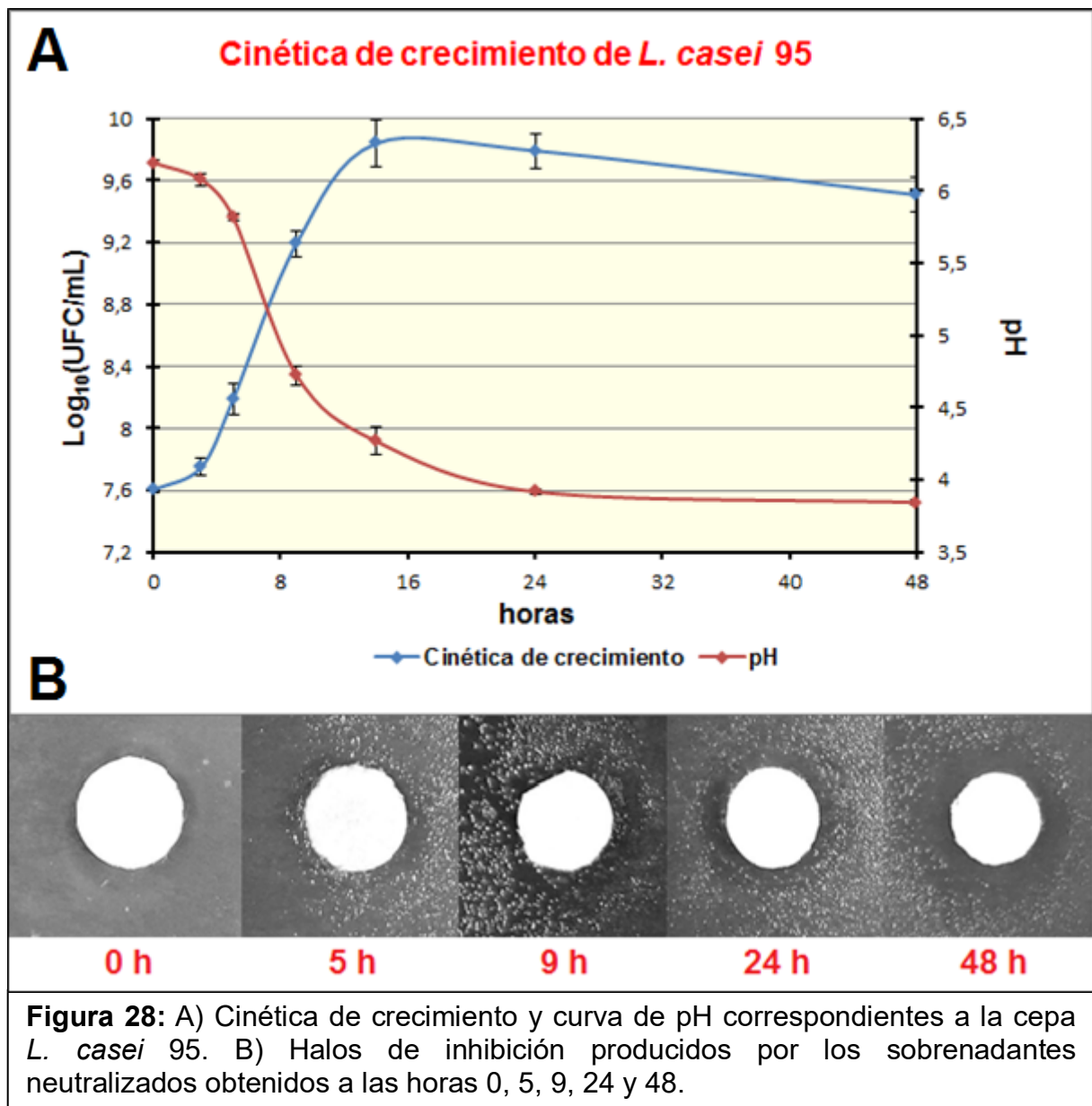
Tabla 12: Valores de T_D de las cepas BAL evaluadas.	
Cepa	T_D (h)
26	1.68
95	2.86
76	1.87

En el caso de *L. casei* 26 (Fig. 27 A) el crecimiento exponencial se mantuvo hasta las 10 h. aproximadamente luego de lo cual llegó a la fase estacionaria en la que permaneció hasta las 48 h.. Con respecto a la actividad acidificante de *L. casei* 26 el medio de cultivo alcanzó valores de pH críticos ($\text{pH} \leq 4.0$) para el crecimiento de *Clostridium* spp. a partir de las 23 h. de crecido y al cabo de las 48 h. llegó a pH 3.86 (Drouin y Lafrenière, 2012; Ghoddusi et al., 2013; Ivy y Wiedmann, 2014). En referencia a los ensayos de difusión en agar RCM la producción de los metabolitos inhibitorios distintos de los ácidos orgánicos se detectó a partir de las 24 h. y fue mayor a las 48 h. de cultivo (Fig. 27 B).



Por otra parte, la cepa *L. casei* 95 (Fig. 28 A) presentó crecimiento exponencial hasta las 14 h. de crecida en caldo MRS y permaneció en fase estacionaria hasta las 48 h. aproximadamente, tiempo en el que el cultivo bacteriano inició su fase de muerte. En cuanto a la producción de acidez como modo de inhibición contra *Clostridium* spp., el

caldo alcanzó el pH 4.0 a las 22 h. de haber sido inoculado y a las 48 h. llegó a pH 3.80. En lo que respecta a la producción de compuestos anticlostridiales se observaron halos de inhibición alrededor de los sobrenadantes neutralizados obtenidos a las 24 y 48 h., siendo mayor la producción de éstos a las 48 h. (Fig. 28 B).



Como la actividad anticlostridial de los sobrenadantes neutralizados de las cepas 26 y 95 de *L. casei* se debió a la síntesis de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, para evaluar la producción de ambos compuestos en forma independiente fue necesario tratar enzimáticamente los sobrenadantes neutralizados correspondientes a las 24 y 48 h. con catalasa y proteinasa K y comparar la actividad inhibitoria remanente (diámetro de halo de inhibición) con la desarrollada por los sobrenadantes neutralizados sin adición enzimática (controles positivos de inhibición) (Tabla 13).

Tabla 13: Diámetro (cm) de los halos de inhibición de los sobrenadantes neutralizados obtenidos a las horas 24 y 48 de las cinéticas de crecimiento de <i>L. casei</i> 26 y <i>L. casei</i> 95.				
Tratamiento	<i>L. casei</i> 26		<i>L. casei</i> 95	
	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.
SN + proteinasa K	0.98	1.28	1.57	1.29
SN+ catalasa	0.75	1.05	0.99	1.05
SN neutralizado (control de actividad inhibitoria)	1.03	1.59	1.62	1.83

En el caso de la cepa 26, existió elevada conservación de la capacidad inhibitoria en todos los sobrenadantes tratados enzimáticamente. La actividad remanente podría deberse a uno o más compuestos anticlostridiales distintos de los evaluados en este trabajo. Con respecto a la producción de bacteriocina, a las 48 h. fue mayor que a las 24 h., de hecho, el sobrenadante de 24 h. tratado con proteinasa K presentó actividad inhibitoria similar al control positivo de inhibición. La generación de bacteriocina estuvo asociada a la fase estacionaria de la cinética bacteriana y no a la fase de crecimiento exponencial, como se discute más adelante, este fenómeno ha sido reportado por otros investigadores. Con respecto a la producción de peróxido de hidrógeno por el aislamiento 26 fue mayor a las 24 h.. La actividad inhibitoria remanente en el sobrenadante de 48 h. tratado con catalasa fue similar a la presentada por el sobrenadante control evidenciando baja presencia de este compuesto a las 48 h. de crecimiento. Al ser el peróxido de hidrógeno un metabolito primario, es coherente que la concentración de peróxido de hidrógeno disminuya a lo largo de la fase estacionaria y coincide con otros trabajos de investigación (Hewitt, 1997; Brashears et al., 2005; Batdorj et al., 2007).

En referencia a la cepa 95 todos los sobrenadantes con adición enzimática también presentaron alta conservación de la acción inhibitoria. Como ya se comentó para el aislamiento 26, dicha actividad remanente se debería a metabolitos antimicrobianos no detectables por los métodos empleados. En cuanto a la actividad bacteriocinogénica de la cepa 95, el sobrenadante de 24 h. tratado con proteinasa K difirió poco de la presentada por el control positivo de inhibición, mientras que el sobrenadante de 48 h. adicionado con proteinasa K sí evidenció reducción de su acción anticlostridial. Por lo tanto, la producción de bacteriocina ocurrió durante la fase estacionaria de la cinética bacteriana.

Con respecto a los sobrenadantes de la cepa 95 tratados con catalasa, se detectó reducción de la actividad inhibitoria a las 24 y 48 h., siendo mayor a las 48 h.. Si bien la síntesis de peróxido de hidrógeno está usualmente asociada a la fase exponencial de crecimiento, varios estudios realizados en cepas de *Lactobacillus* spp. encontraron que la producción de este compuesto aumenta a lo largo de la fase de crecimiento exponencial y se mantiene estable durante la fase estacionaria o sigue aumentando en dicha fase. Es importante señalar que este tipo de cinéticas de producción pueden producirse por acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo (Zalán et al., 2005; Adesokan et al., 2010; Martín y Suárez, 2010; Enitan et al., 2011).

En relación a las bacteriocinas, tradicionalmente se considera que estos compuestos son productos del metabolismo primario porque su síntesis y máxima producción están asociadas a la etapa de crecimiento exponencial (trofofase), en lugar de la fase estacionaria (idiofase) en la cual el microorganismo pone en marcha rutas metabólicas secundarias (Saucier, 1997; Mateos, 2000; Shayesteh et al., 2014). Varias razones que se discuten a continuación hacen necesario cuestionar esta afirmación.

A nivel conceptual existen dos formas de distinguir los metabolitos primarios de los secundarios, de acuerdo a su función biológica y según la fase de crecimiento en que se producen. De acuerdo a la función biológica los metabolitos primarios son compuestos esenciales para la supervivencia y el bienestar del microorganismo productor. En cambio los metabolitos secundarios son sustancias no esenciales que intervienen en la interacción del microorganismo productor con su entorno y permiten mejorar su capacidad para crecer, dispersarse, competir frente a otros microorganismos o protegerse de depredadores (Davies, 1992; Vining, 1992; Dykes, 1995). Desde este punto de vista, las bacteriocinas deberían ser consideradas metabolitos secundarios.

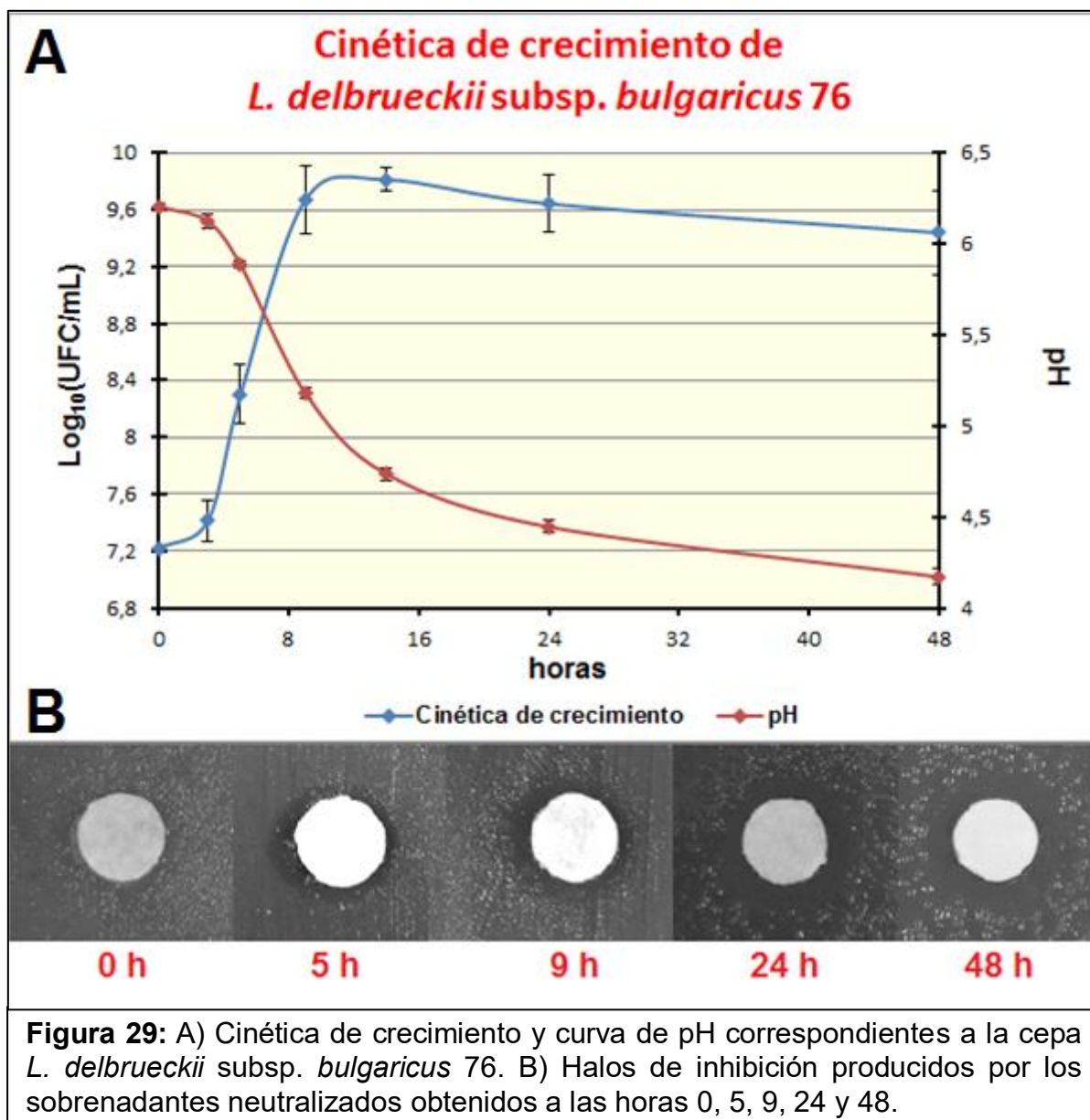
Según la fase de crecimiento, los metabolitos primarios son los compuestos sintetizados durante la fase de crecimiento activo (trofofase) en forma continua, mientras que los metabolitos secundarios son generados en la fase estacionaria del desarrollo bacteriano (idiofase) y su producción no es continua. Se debe aclarar que el metabolismo secundario también puede desencadenarse por depleción de un nutriente o por adición o biosíntesis de un inductor durante la fase de crecimiento exponencial (Currell y van Dam-Mieras, 1997; Demain, 1998; Shayesteh et al., 2014; Marwati et al., 2018). Esta definición no resulta adecuada para clasificar todas las bacteriocinas, porque algunas de ellas, por ejemplo macedovicina, requieren para su síntesis la presencia de ciertos compuestos, en consecuencia no podrían ser considerados metabolitos primarios (Georgalaki et al., 2013). Asimismo, la cinética de producción de ciertas bacteriocinas como nisina, pediocina, weisellina A y amylovorina puede ser alterada cuando la cepa productora se cultiva en condiciones de estrés o que no son óptimas para el crecimiento bacteriano. Esto también es posible en cultivos mixtos (Guerra et al., 2001; Neysens et al., 2003; Papagianni y Papamichael, 2014).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos sintetizados por las BAL tienen cinéticas de metabolito primario, pero existen bacteriocinas que mantienen su producción durante la fase estacionaria del crecimiento como la pentocina TSHS y la sintetizada por *L. casei* LA-1 (Motahari et al., 2016). Por otra parte, varios trabajos científicos han encontrado bacteriocinas con cinéticas de producción secundaria (Ogunbanwo et al., 2003; Campos et al., 2006; Rajaram et al., 2010; Noordiana et al., 2013; Sure et al., 2016; Marwati et al.,

2018). De hecho, esta es una característica muy frecuente en las bacterias ácido lácticas. Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos considerados metabolitos secundarios son los producidos por *L. plantarum* LPCO10 y *L. plantarum* MTCC 1407, así como la pediocina AcH y pentocina B96 (Garcha y Sharma, 2013; Papagianni y Papamichael, 2014; Shayesteh et al., 2014; Motahari et al., 2016; Kholia, 2017).

A todo lo anterior hay que agregar que para determinar la cinética de producción de una bacteriocina además de cuantificar a lo largo del tiempo los niveles de péptido antimicrobiano en el medio de cultivo, deberían considerarse otros procesos que tienen lugar e influyen en la concentración de la bacteriocina. Algunos de estos procesos son la degradación del metabolito por proteasas específicas y no-específicas que se liberan durante la lisis celular y la adsorción del compuesto a la superficie celular de la cepa bacteriocinogénica (Zamfir et al., 2000; Eijsink et al., 2002). Por otra parte, en los ensayos de inhibición realizados para evaluar la actividad anticlostridial de los sobrenadantes neutralizados no se puede descartar la presencia de otros compuestos inhibitorios no identificados con los cuales las bacteriocinas presentes establezcan sinergismo produciendo mayor grado de inhibición (Noll et al., 2012).

Con respecto a la cinética de crecimiento de *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* 76 (Fig. 29 A), la fase de crecimiento exponencial se extendió hasta las 10 h. de haber inoculado la cepa en el caldo MRS, mientras que la fase estacionaria ocurrió entre las 10 y 24 h. aproximadamente, luego de lo cual se inició la fase de muerte.



La curva de pH asociada al crecimiento de esta cepa en caldo MRS llegó a un pH de 4.18 a las 48 h. de incubación que al no ser suficientemente bajo no permitiría generalizar el efecto inhibitorio de los sobrenadantes sin neutralizar detectado sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 a otras especies de bacterias ácido butíricas. En referencia a la inhibición por peróxido de hidrógeno (Fig. 29 B), ésta se pudo detectar en los sobrenadantes neutralizados obtenidos a las 5, 9, 24 y 48 horas, siendo mayor a las 48 h.. Como se explicó para la cepa 95, el aumento de la inhibición producida por peróxido de hidrógeno durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, podría deberse a la acumulación de este metabolito en el medio de cultivo.

4.6 Evaluación de la acción inhibitoria de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB sobre aislamientos de *Clostridium* nativos de productos lácteos.

Los aislamientos *L. casei* 26 y 95 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 fueron seleccionados para evaluar su capacidad inhibitoria contra las especies de *Clostridium* más comúnmente aisladas de la cadena estudiada. Las cepas fueron seleccionadas por presentar mayor actividad anticlostridial y producir compuestos inhibitorios adicionales a ácidos orgánicos (Tabla 10). En el análisis también se incluyó la cepa comercial *L. casei* BAL C. Se consideraron 5 cepas de cada especie para determinar si la susceptibilidad detectada fue especie o cepa-dependiente (Garde et al., 2014; Fredua-Agyeman et al., 2017). En la Figura 30 se observan los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes de los aislamientos previamente citados contra cepas de *Clostridium*.

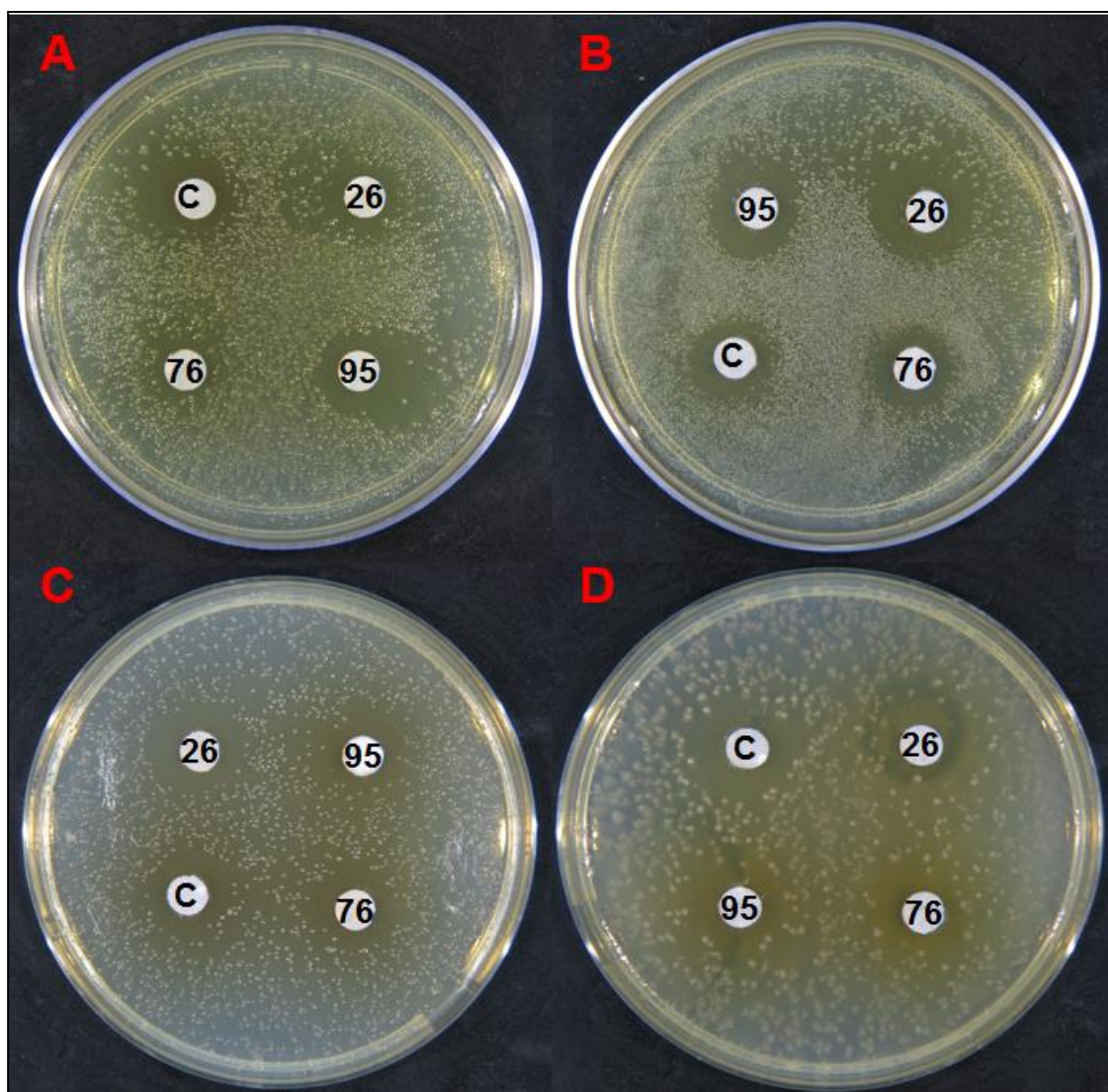


Figura 30: Inhibición producida por los sobrenadantes de las cepas 26, 76, 95 y BAL C (indicada como “C”) contra: A) *C. tyrobutyricum* (23.4); B) *C. sporogenes* (16.3); C) *C. beijerinckii* (33.6) y D) *C. butyricum* (45.1).

Las Fig. 31 y 32 presentan los resultados de la actividad inhibitoria, diámetro de los halos de inhibición, de cada una de las cepas de BAL frente a las cuatro especies de *Clostridium* evaluadas en el estudio. Los análisis estadísticos realizados para determinar si la inhibición presentada por cada especie de *Clostridium* era cepa o especie dependiente se encuentran recopilados en el Anexo 2.1.

En la Figura 31 A, que corresponde a los halos de inhibición generados por el sobrenadante de *L. casei* 26, se pudo apreciar que *C. butyricum* fue la especie más sensible a la actividad inhibitoria mientras que *C. sporogenes* presentó la mayor resistencia. De las cepas de *Clostridium* consideradas *C. tyrobutyricum* 20.1 y *C. sporogenes* 31.3 experimentaron la mayor resistencia, mientras que *C. tyrobutyricum* 23.4 y *C. butyricum* 10.2 resultaron las más inhibidas. De acuerdo al análisis estadístico de los datos, la acción anticlostridial ejercida por *L. casei* 26 fue especie-dependiente sobre *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum* ($p>0.05$), mientras que en las restantes especies existió variación a nivel de cepa ($p<0.05$).

Con respecto a la actividad inhibitoria de *L. casei* 95 (Fig. 31 B), presentó baja variabilidad intra-especie para las cepas de *C. butyricum* ($p>0.05$), en las restantes especies evaluadas la acción inhibitoria varió a nivel de cepa ($p<0.05$). *C. butyricum* resultó la especie más sensible a la inhibición ejercida por el sobrenadante de *L. casei* 95. Las cepas de *C. beijerinckii* fueron las más resistentes. La máxima actividad inhibitoria de *L. casei* 95 se detectó sobre *C. tyrobutyricum* 23.4 y la mínima sobre *C. sporogenes* 31.3.

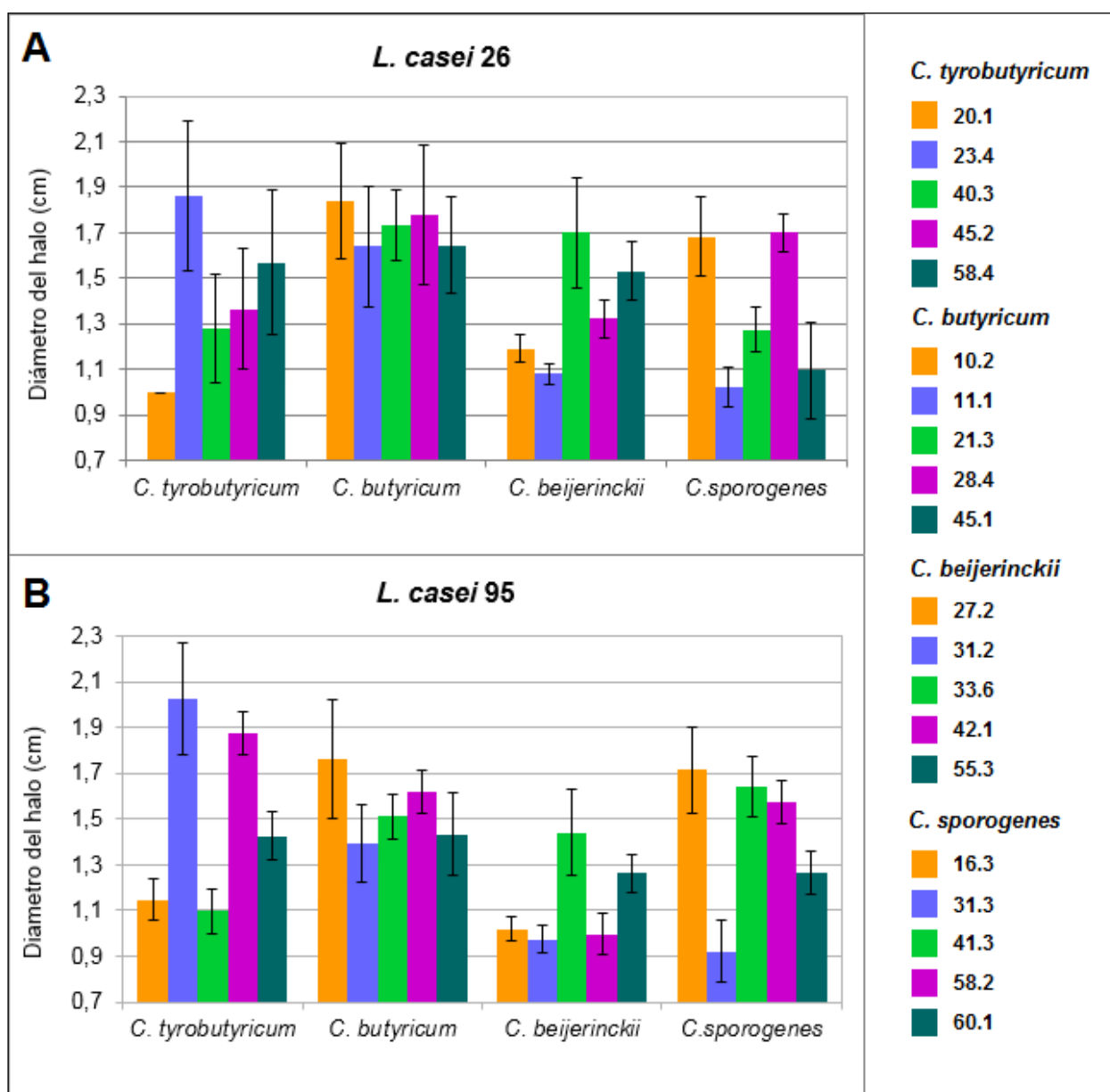


Figura 31: Gráficas del diámetro de los halos (cm) producidos en cepas de *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* en presencia de los sobrenadantes pertenecientes a los aislamientos 26 (Fig. A) y 95 (Fig. B). A la derecha se indican las cepas de *Clostridium* evaluadas.

En referencia al efecto anticlostridial ejercido por el sobrenadante de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 (Fig. 32 A), la especie más sensible fue *C. butyricum* y en segundo lugar *C. tyrobutyricum*, mientras que *C. sporogenes* resultó la menos sensible, siendo la cepa 16.3 la más resistente. La cepa más inhibida por el aislamiento 76 fue *C. tyrobutyricum* 23.4. El análisis estadístico de los datos permitió determinar que la actividad anticlostridial del aislamiento 76 contra *C. butyricum* y *C. sporogenes* fue especie-dependiente ($p > 0.05$), en cambio para *C. tyrobutyricum* y *C. beijerinckii* existió variabilidad significativa a nivel de cepa ($p < 0.05$).

Con respecto a la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa comercial BAL C (Fig. 32 B), la especie que presentó mayor susceptibilidad fue *C. butyricum* y la menos sensible

C. sporogenes. De las cepas evaluadas *C. butyricum* 10.2 resultó la más inhibida, mientras que *C. beijerinckii* 27.2 fue la menos sensible. De acuerdo al análisis estadístico el efecto inhibitorio de *L. casei* BAL C sobre *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* y *C. butyricum* fue especie-dependiente ($p>0.05$). En el caso de *C. beijerinckii* la sensibilidad varió a nivel de cepa ($p<0.05$).

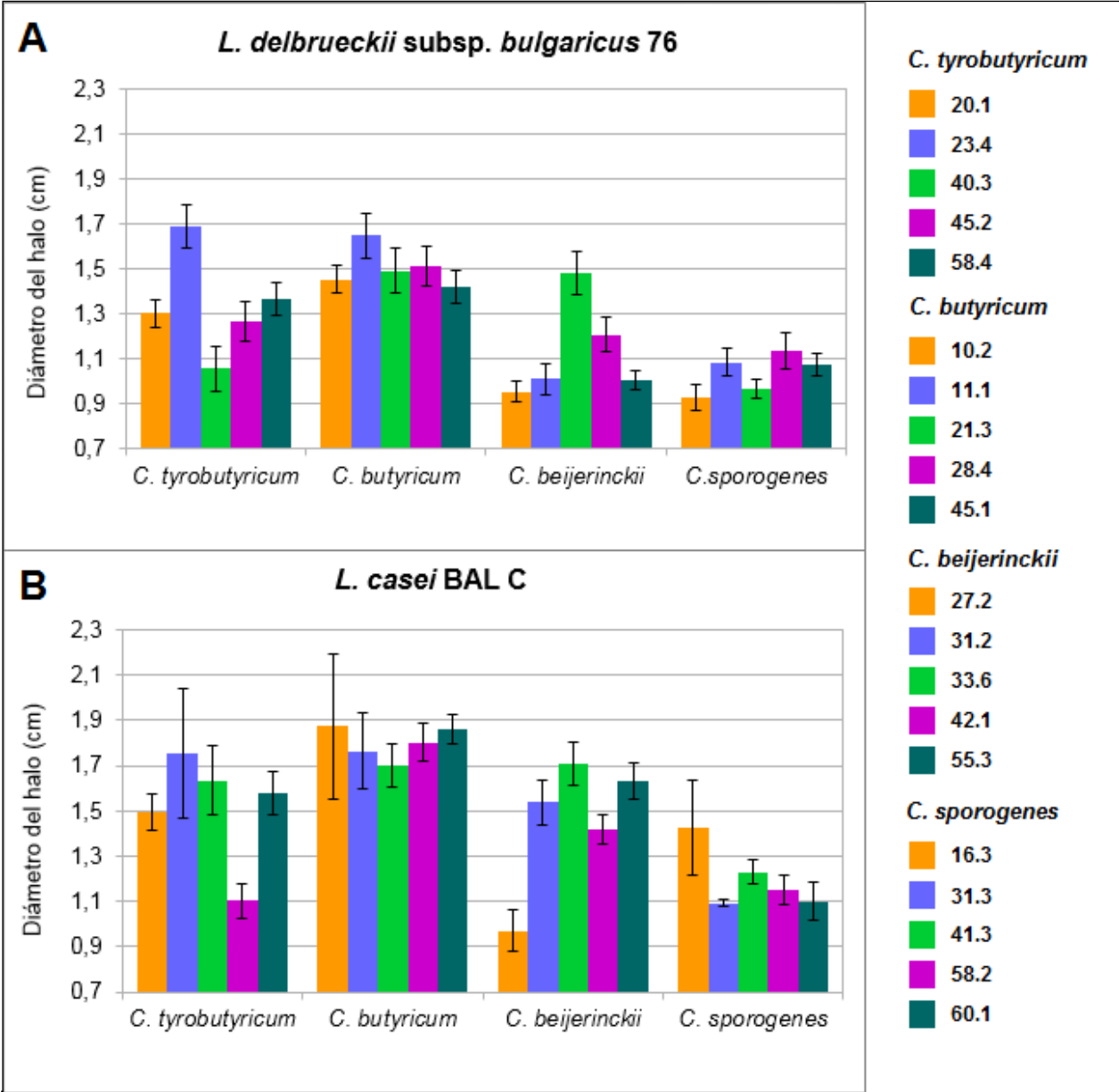
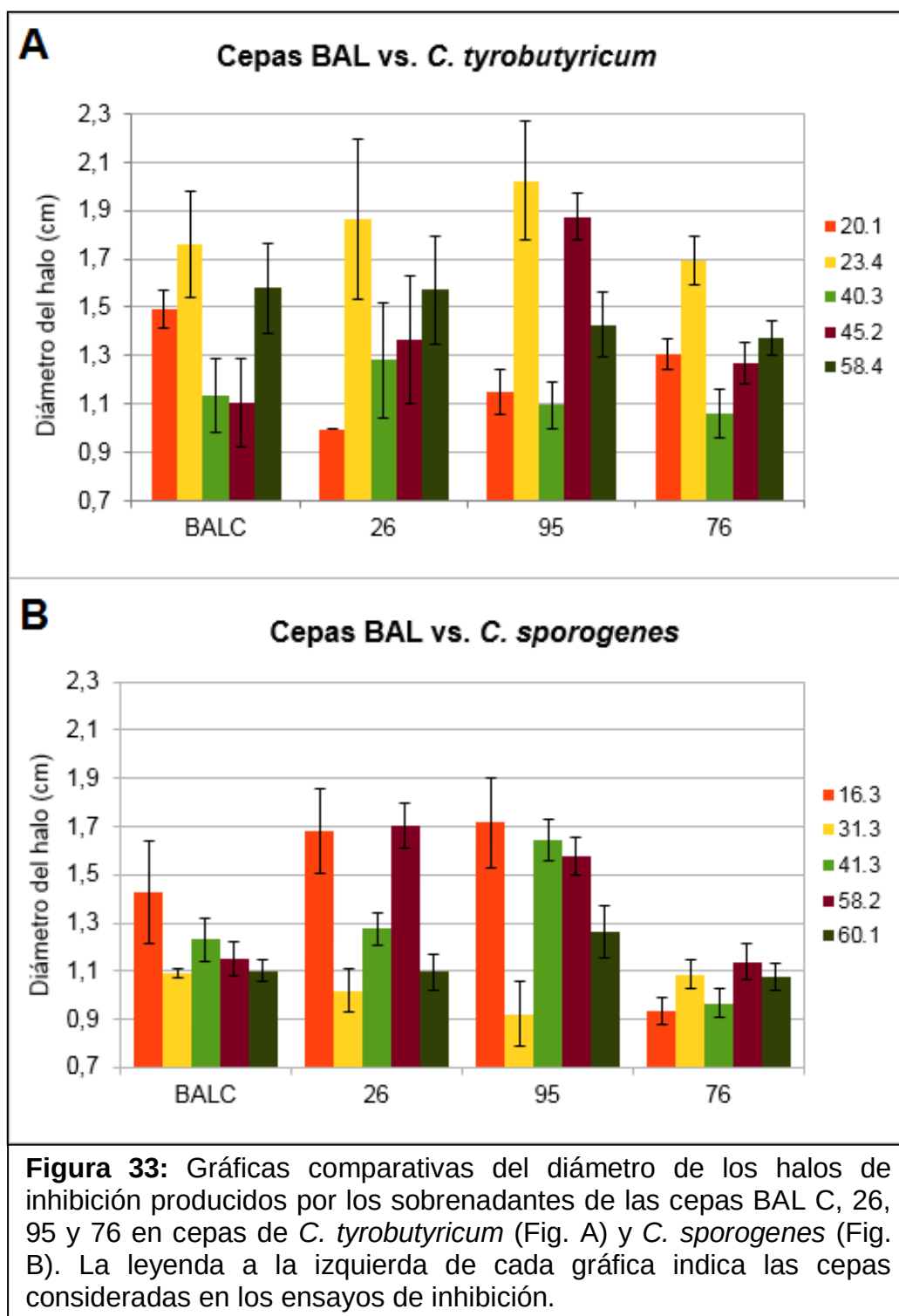
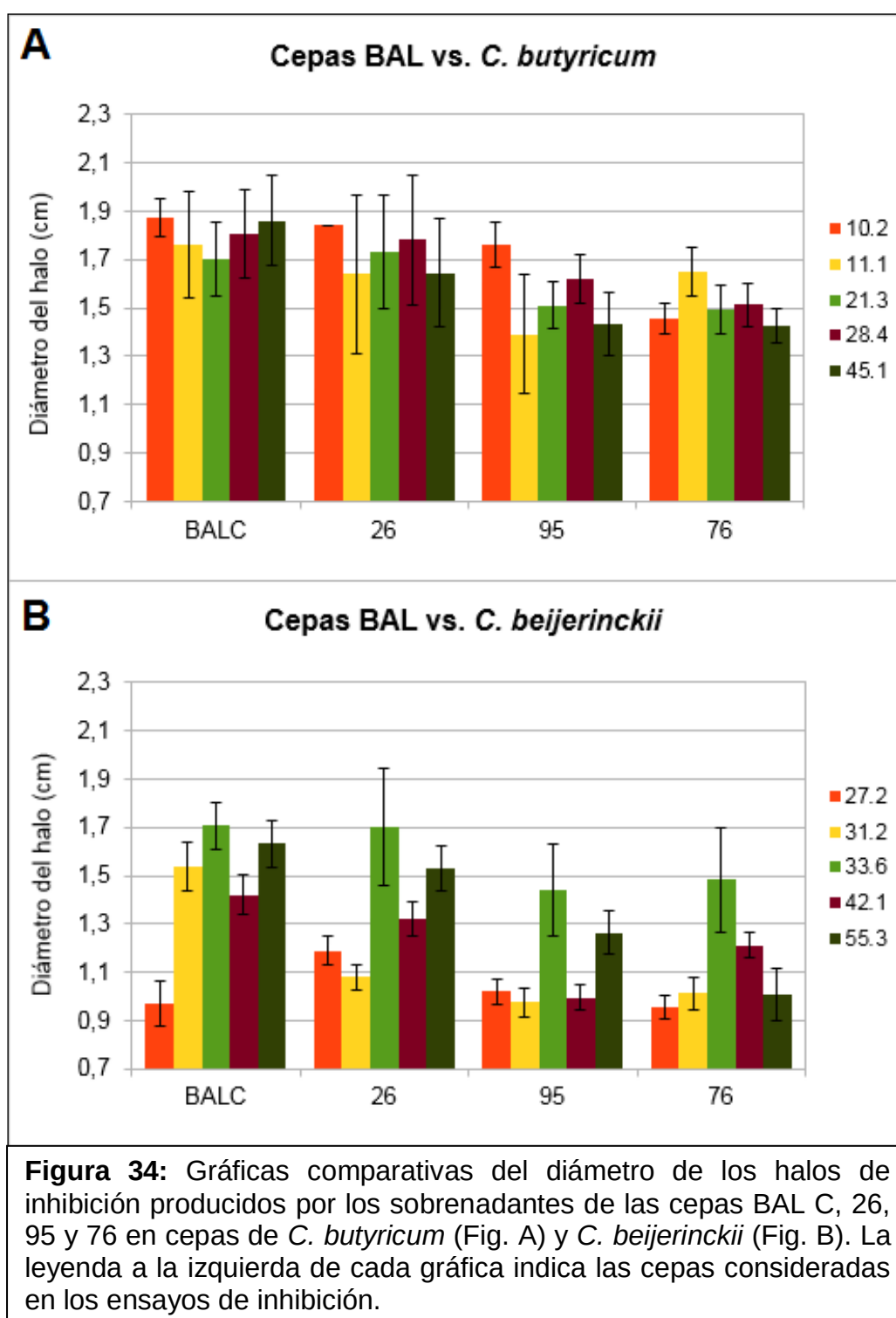


Figura 32: Gráficas del diámetro de los halos (cm) producidos en cepas de *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* en presencia de los sobrenadantes pertenecientes al aislamiento 76 (Fig. A) y la cepa BAL C (Fig. B). A la derecha se indican las cepas de *Clostridium* evaluadas.

Para poder comparar la actividad inhibitoria entre las cepas 26, 95, 76 y BAL C se graficaron para cada especie de *Clostridium* los datos de inhibición ordenados de acuerdo a la cepa de BAL (Fig. 33 y 34) y fueron analizados estadísticamente (Anexo 2.2).





Según los resultados obtenidos los sobrenadantes de los tres aislamientos presentaron actividad inhibitoria contra todas las cepas de *Clostridium* autóctonas de productos lácteos consideradas. Se debe destacar que el sobrenadante de *L. casei* 95 produjo la máxima inhibición sobre *C. tyrobutyricum*, siendo seguida en orden de actividad inhibitoria por los sobrenadantes de BAL C y *L. casei* 26. Asimismo *L. casei* (95, 26) fueron las que mayor

actividad anticlostridial ejercieron sobre *C. sporogenes*, además la acción inhibitoria de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 contra esta especie fue similar a la de la cepa de uso comercial *L. casei* BAL C. Con respecto a la inhibición ejercida sobre *C. butyricum*, el sobrenadante de BAL C tuvo la mayor acción antimicrobiana, mientras que los sobrenadantes correspondientes a los aislamientos 76 y 95 ejercieron la menor capacidad inhibitoria. Por otra parte, el sobrenadante de BAL C fue el que más inhibición ejerció sobre *C. beijerinckii*, siendo seguida por el aislamiento 26. Los efectos inhibitorios producidos por las cepas 76 y 95 sobre esta especie fueron los más bajos y resultaron similares entre sí.

Los hallazgos aquí reportados son de gran importancia si se tiene en cuenta el estudio realizado por Bermúdez et al. (2016). En éste se analizaron las dinámicas estacionales de las bacterias esporuladas anaerobias estrictas presentes en plantas de producción quesera del Uruguay, hallándose que *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* son las especies predominantes. Debido a esto *L. casei* 95 y 26 resultarían de interés por su capacidad para controlar el desarrollo de dichas especies. Es importante aclarar que la actividad anticlostridial del sobrenadante de *L. casei* 95 contra ambas especies varió a nivel de cepa. Asimismo existieron diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas de *C. tyrobutyricum* en presencia del sobrenadante de *L. casei* 26. En consecuencia la efectividad de éstos aislamientos para evitar la aparición de hinchazón tardía dependería de la sensibilidad de las cepas de bacterias ácido butíricas presentes en queso. En referencia a lo anterior se debe mencionar que no todas las cepas de *Clostridium* spp. presentes en leche cruda acceden a los quesos. Asimismo aquellas que alcanzan el producto final difieren en su capacidad para provocar hinchazón tardía (Cremonesi et al., 2012; Bermúdez et al., 2016; Garde et al., 2018).

Finalmente es destacable que el sobrenadante de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 tuvo acción anticlostridial especie-dependiente para *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum* por lo que teóricamente su capacidad inhibitoria se extendería a un amplio rango de cepas de las especies mencionadas. También hay que indicar que con excepción de *C. sporogenes*, para las restantes cepas de *Clostridium* consideradas la actividad anticlostridial del sobrenadante del aislamiento 76 fue inferior a la presentada por los sobrenadantes de las otras cepas de BAL evaluadas. En el caso de *C. sporogenes* el poder inhibitorio de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 fue similar al de BAL C.

4.7 Purificación y caracterización de compuestos anticlostridiales

Con la cepa biocontroladora comercial *L. casei* BAL C se estandarizó el protocolo de extracción para los aislamientos bacteriocinogénicos 26 y 95 de *L. casei* así como la metodología de purificación por HPLC. Como se muestra en la Figura 35 para cada cepa se verificó mediante ensayo de inhibición la presencia del compuesto inhibitorio en el precipitado obtenido por la extracción con acetona.

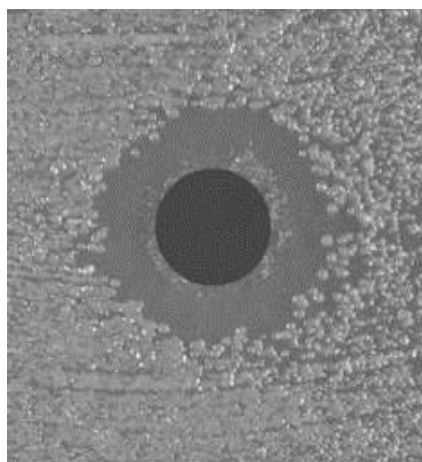


Figura 35: Verificación de la acción inhibitoria del precipitado obtenido para BAL C.

Los cromatogramas obtenidos por HPLC para los extractos crudos pertenecientes a las cepas evaluadas, así como el de la línea base (caldo MRS) se encuentran compilados en el Anexo 3. Los cromatogramas pertenecientes a los extractos crudos analizados presentaron baja resolución. Esto podría deberse a que los extractos crudos fueron obtenidos a partir de cultivos en caldo MRS que es un medio de cultivo químicamente no definido, lo que implica un mayor contenido de péptidos, proteínas y otros compuestos, que aumentan las señales en los cromatogramas y la dificultad para resolverlas. Además las cepas BAL producen péptidos, proteínas y otras sustancias que incrementan el número de señales a separar. Debido a esto, suele ser necesario aplicar diferentes técnicas cromatográficas previas a la realización de la cromatografía de HPLC (De Vuyst y Leroy, 2007; Pingitore et al., 2007). En esta investigación la metodología de purificación no involucró técnicas cromatográficas previas a la separación mediante HPLC, esto también podría explicar la resolución obtenida en los cromatogramas.

Por otra parte, ciertos componentes del medio de cultivo permanecen en el extracto crudo y son difíciles de resolver por la técnica de HPLC de fase reversa, por ejemplo péptidos hidrofóbicos que no son completamente consumidos por la bacteria y no pueden ser separados de la bacteriocina de interés (Guerra et al., 2001; Saavedra y Sesma, 2011). Sumado a lo anterior hay que considerar que en los sobrenadantes libres de células bacterianas a partir de los cuales se obtienen los extractos crudos, quedan fragmentos de pared celular cuyas cargas negativas son capaces de establecer interacciones con las

bacteriocinas lo que puede prevenir la adsorción de éstas en la columna cromatográfica (Borzenkov et al., 2014).

En el caso de BAL C la comparación del cromatograma obtenido con el correspondiente a la línea de base permitió detectar la fracción de interés (P_0) entre los 14 y 16 min. de comenzada la elución. Dicha fracción fue eluida y sometida a ensayo de inhibición en placa (Fig. 36), verificándose la presencia de actividad inhibitoria, por lo que se conservó para su análisis por espectrometría de masa.

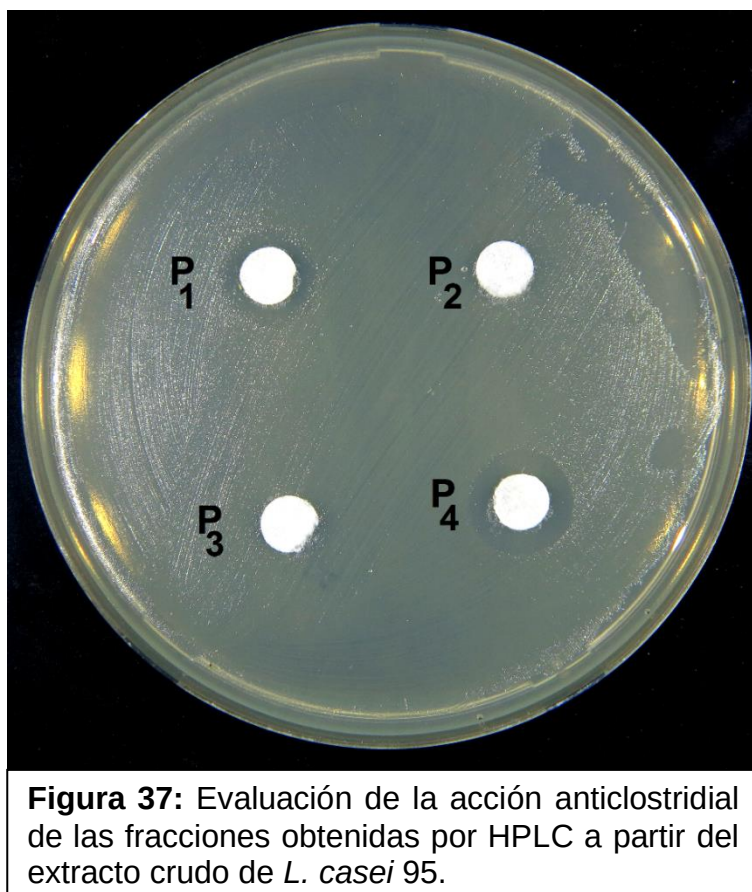


Figura 36: Actividad anticlostridial de la fracción separada por HPLC a partir del extracto crudo de BAL C.

En el cromatograma de *L. casei* 95, se identificaron cuatro regiones que comparadas con el espectro del blanco presentaron mayor área bajo la curva, éstas fueron: P_1 , P_2 , P_3 y P_4 . La elución de estas fracciones ocurrió entre: 3 a 6 min., 7 a 9 min., 10 a 14 min. y 14 a 21 min., respectivamente. Al evaluar la actividad inhibitoria de las fracciones eluidas en placa (Fig. 37) sólo se observaron halos de inhibición para los picos P_1 y P_4 los cuales se conservaron para su estudio por espectrometría de masa. La existencia de dos fracciones con actividad inhibitoria implicaría que *L. casei* 95 produce al menos dos compuestos bioactivos inhibidores de *Clostridium* spp.. Es importante indicar que en el caso de las cepas 95 y 26 los extractos crudos así como las fracciones de HPLC con actividad anticlostridial generaron halos de inhibición de menor diámetro que los respectivos sobrenadantes neutralizados. Una de las causas de esto podría ser que el método de extracción empleado no permita obtener altos rendimientos de los compuestos bioactivos, asimismo parte de los metabolitos extraídos podrían haber perdido su actividad biológica por la acetona (Pal et al., 2010; Crowell et al., 2013).

También es probable que parte de los compuestos antimicrobianos se haya desnaturizado por el tratamiento térmico de los extractos crudos y fracciones de HPLC durante el proceso de rotaevaporación. Investigaciones previas han determinado en la

nisina y otras bacteriocinas que el tratamiento térmico puede inducir la reacción de Maillard entre grupos amino de éstas y grupos carbonilo de carbohidratos presentes en el medio, provocando reducción de la acción inhibitoria ejercida por dichos péptidos. En referencia a esto, se debe mencionar que los extractos crudos fueron obtenidos a partir de cultivos en caldo MRS, medio de cultivo susceptible a la reacción de Maillard (Abdullah et al., 2010; Sant'Anna et al., 2011; Menon et al., 2013; Woraprayote, 2014). En la Tabla 10 se pudo observar que los sobrenadantes neutralizados de las cepas 26 y 95 tuvieron menor actividad antimicrobiana cuando se trataron térmicamente, lo que refuerza la hipótesis planteada.



Con respecto al cromatograma correspondiente a *L. casei* 26, se detectaron cuatro regiones con mayor área bajo la curva en comparación al espectro del blanco, las mismas fueron designadas P₁, P₂, P₃ y P₄ que eluyeron respectivamente a los tiempos: 3 a 4 min., 4 a 6 min., 14 a 20 min. y entre 22 y 26 min.. En la placa en la cual se evaluó la actividad inhibitoria de las fracciones mencionadas solo fueron detectados halos de inhibición para P₂ y P₄ (Fig. 38), las mismas se conservaron para su análisis por espectrometría de masa. De acuerdo a esto *L. casei* 26 produciría al menos dos presuntos compuestos peptídicos anticlostridiales.

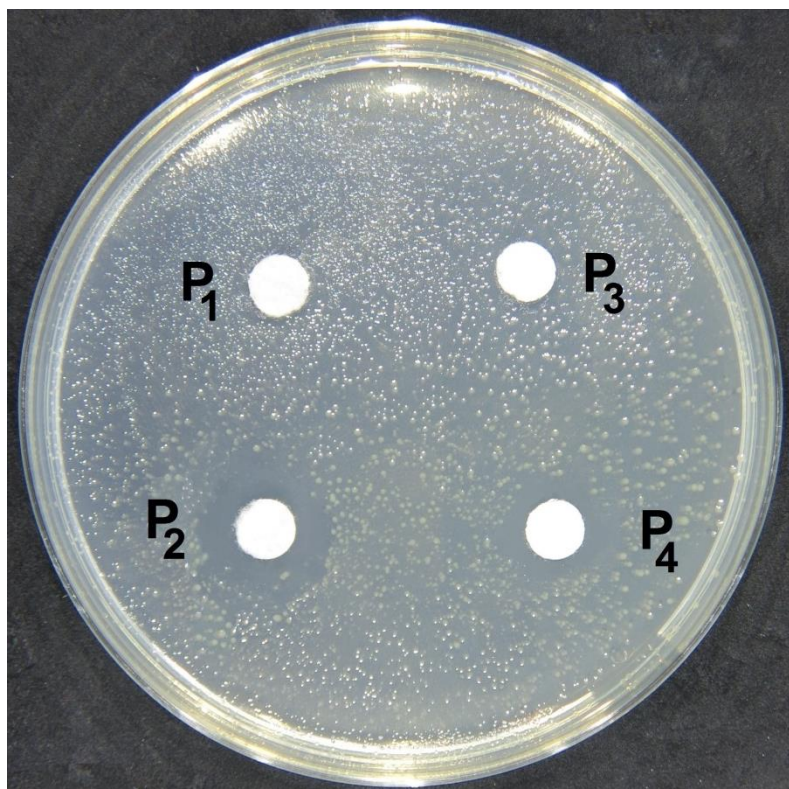


Figura 38: Evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones colectadas por HPLC a partir del extracto crudo de *L. casei* 26.

En la Tabla 14 se indican los tiempos de elución asociados a las fracciones de HPLC obtenidas para las cepas BAL C, 95 y 26. También se informan cuáles de ellas presentaron actividad anticlostridial.

Tabla 14: Fracciones de HPLC obtenidas a partir de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26 y 95. Se indican los tiempos de elución asociados y la ausencia (-) o presencia (+) de actividad anticlostridial.			
Cepa	Fracción HPLC	Tiempo de elución (min.)	Actividad anticlostridial
BAL C	P ₀	14 - 16	+
26	P ₁	3 - 6	-
	P ₂	7 - 9	+
	P ₃	10 - 14	-
	P ₄	14 - 21	+
	P ₄	14 - 21	+
95	P ₁	3 - 4	+
	P ₂	4 - 6	-
	P ₃	14 - 20	-
	P ₄	22 - 26	+

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC[BP = 1162.5, 62]

Mass (m/z)

% Intensity

1162.5420

1425.6934

1252.6237

1144.5382

1178.5718

1305.6710

1362.6155

1441.6973

1565.7793

1710.8545

853.4219

861.0776

1002.4849

1074.5826

1095.5987

1141.6973

1305.6710

1362.6155

1441.6973

1565.7793

1710.8545

62.2

Figure 39: Espectro de masa (MS) obtenido por MALDI-TOF correspondiente al compuesto anticlostridial producido por BAL C.

Figura 39: Espectro de masa (MS) obtenido por MALDI-TOF correspondiente al compuesto anticlostridial producido por BAL C.

Es importante indicar que no se pueden descartar como causa de la baja resolución del espectro de masa la presencia de sustancias contaminantes así como de otras proteínas y la baja concentración de la bacteriocina a identificar (McHugh y Arthur, 2008; Spivak, 2010; Noble y MacCoss, 2012; Relloso et al., 2015). Las BAL son bacterias nutricionalmente exigentes que requieren para su crecimiento medios de cultivo ricos y complejos, como el MRS o el M17, compuestos por varias fuentes de nitrógeno y factores de crecimiento, debido a esto no es posible emplear medios de cultivo químicamente definidos también conocidos como sintéticos (Benaissa et al., 2017). El uso de medios de cultivo complejos permite obtener niveles adecuados de bacteriocinas, pero tiene como desventaja un mayor contenido de proteínas y otros componentes en las fracciones de HPLC, porque pueden interferir en el proceso de purificación. Por ejemplo hay péptidos hidrofóbicos que no son totalmente consumidos por la bacteria durante su crecimiento que por cromatografía no se logran separar de la bacteriocina de interés (Guerra et al., 2001; Saavedra y Sesma, 2011).

Como consecuencia de lo mencionado anteriormente, la purificación de un metabolito debe realizarse en varios pasos, siendo necesario partir de volúmenes de cultivo bacteriano grandes para obtener rendimientos adecuados (Sharma et al., 2016; Johnson et al., 2017). En esta investigación a pesar de intentar optimizar el protocolo de extracción y purificación no fue posible obtener un espectro de masa de buena calidad para la fracción P_0 de BAL C a partir del cual poder identificar el presunto péptido, tampoco se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS).

Con respecto a *L. casei* 95, la fracción P_1 no generó el espectro de masa. Según De Vuyst y Leroy (2007), así como Saraiva et al. (2014) la ausencia de espectro de masa puede deberse a que el péptido antimicrobiano es completamente degradado por proteasas producidas por la cepa bacteriocinogénica, las cuales pueden permanecer en el extracto crudo obtenido. En el caso de la fracción P_1 , la presencia de halo inhibitorio (Fig. 37) sugeriría la existencia de péptido anticlostridial en dicha fracción, pero la ausencia de espectro de masa podría implicar que proteasas presentes en el sobrenadante degradaron gran parte de las moléculas bioactivas, por lo cual la cantidad remanente del compuesto anticlostridial no sería suficiente para su análisis por espectrometría de masa.

La hipótesis planteada también podría explicar porqué los halos de inhibición producidos por las fracciones P_1 y P_4 son menores respecto al halo generado por el sobrenadante neutralizado (Fig. 25) a pesar de estar concentradas por rotaevaporación. Cabe aclarar que en algunas investigaciones se realizan tratamientos térmicos para inactivar las proteasas endógenas de las cepas BAL evaluadas y evitar la degradación de las bacteriocinas sintetizadas, por ejemplo a 80 °C durante 10 min. o 70 °C por 20 min., en este sentido es importante indicar que los extractos crudos obtenidos en este trabajo fueron rotavaeporados a 70 °C durante dos horas para concentrar los compuestos anticlostridiales, por lo que se esperaría haber inactivado las proteasas existentes (Dündar, 2006; Shin et al., 2008; Sadishkumar y Jeevaratnam, 2017).

La falta de espectro de masa para la fracción P_1 , no permitió determinar el peso molecular del compuesto anticlostridial. El único dato obtenido para la fracción P_1 es que conservó su actividad inhibitoria luego de ser concentrada por rotaevaporación, proceso realizado a 70 °C por 45 min., por lo que el compuesto antimicrobiano presente en dicha fracción es termoestable. Con el fin de poder caracterizar el presunto péptido anticlostridial contenido en la fracción P_1 sería necesario cambiar completamente la metodología de extracción y

purificación de la bacteriocina o si se asume que se trata de un compuesto de naturaleza no considerado en esta investigación, implementar estrategias específicas para su detección, extracción y purificación.

En referencia a la fracción P₄ de *L. casei* 95, se obtuvo un espectro de masa de buena calidad (Fig. 40). En éste se detectaron cinco señales de alta intensidad relativa cuyas relaciones m/z fueron: 1120.5223; 1144.5190; 1162.5178; 1291.5745 y 1425.6570. La señal de 1162.5178 m/z correspondió al pico molecular del compuesto. En consecuencia, el peso molecular del péptido anticlostridial presente en dicha fracción fue 1162.52 Da, aunque como en el caso de BAL C, podría ocurrir que el espectro de masa correspondiera a un fragmento del péptido problema como resultado de su degradación.

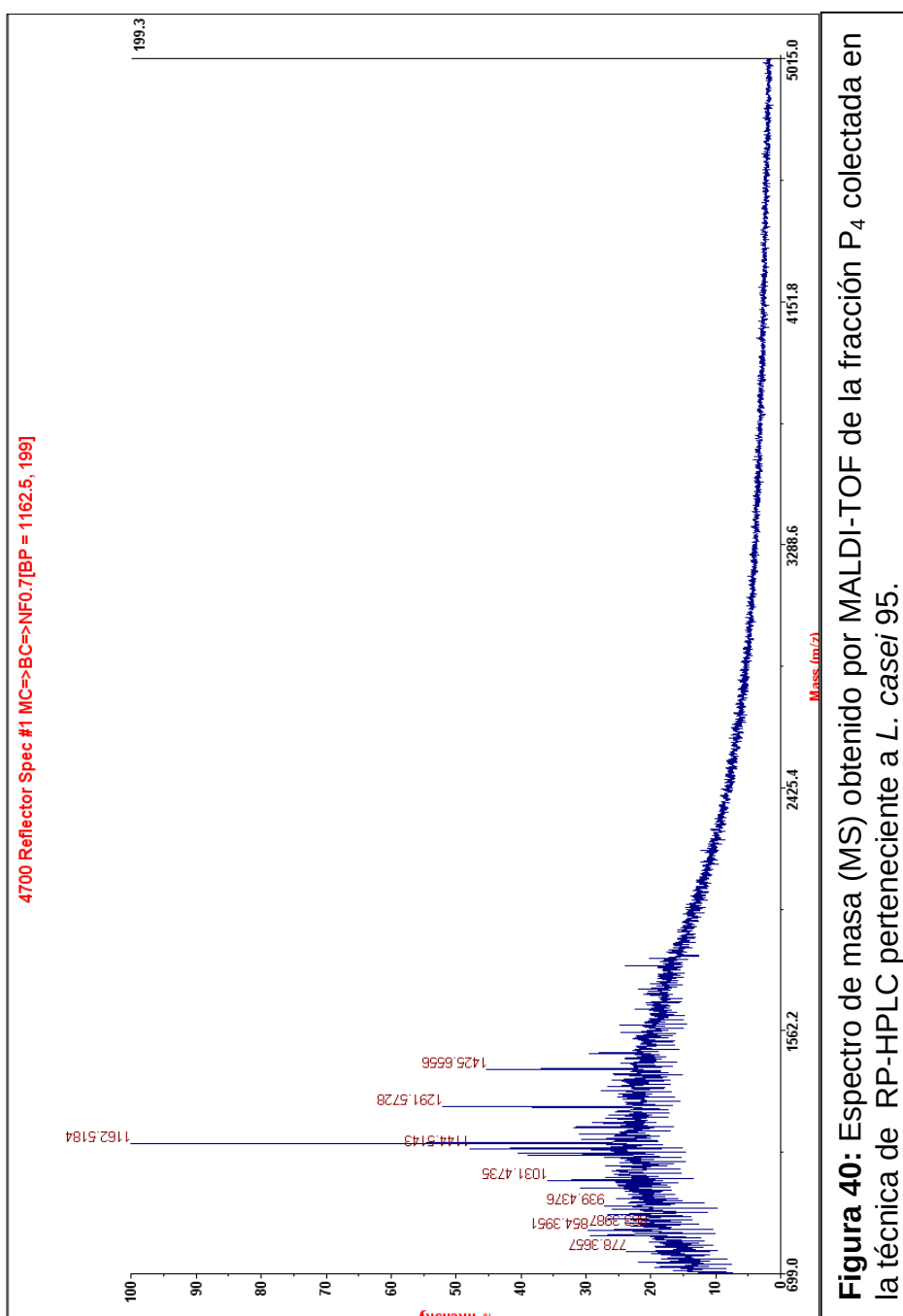


Figura 40: Espectro de masa (MS) obtenido por MALDI-TOF de la fracción P₄ colectada en la técnica de RP-HPLC perteneciente a *L. casei* 95.

Los iones detectados fueron buscados en la base de datos de MASCOT pero el score fue inferior al requerido para asumir que el resultado era significativo ($p < 0.05$) por lo que el péptido no pudo ser identificado. A pesar de todo lo anterior, hay que tener en cuenta que los metabolitos inhibitorios de peso molecular mayor a 1KDa producidos por BAL que se conocen actualmente son bacteriocinas (Šušković et al., 2010; Samuel, 2015; Shembil, 2016). Dado que el peso molecular del compuesto bioactivo presente en la fracción P₄ fue 1162.52 Da y en base a lo previamente comentado, el compuesto inhibitorio sería una bacteriocina. Por otra parte, la fracción P₄ conservó la actividad anticlostridial luego del tratamiento de rotaevaporación realizado a 70 °C durante 45 min. Todas las clasificaciones de bacteriocinas concuerdan que los péptidos antimicrobianos termoestables pertenecen a las clases I o II, la clase III corresponde a péptidos termosensibles de peso molecular superior a 2.5 kDa, por lo tanto, el metabolito evaluado podría pertenecer a la clase I o II (Johnson et al., 2017).

En el análisis MS/MS se pudo obtener espectros de fragmentación a partir de las señales con m/z : 1162.5178; 1291.5745 y 1425.6570. Dichos espectros se muestran en las Figuras 41 a 43. En el Anexo 4 se recopilaban los valores de masa (m/z) correspondientes a los iones obtenidos en las respectivas fragmentaciones. En ninguno de los casos fue posible obtener información estructural sobre la bacteriocina de *L. casei* 95.

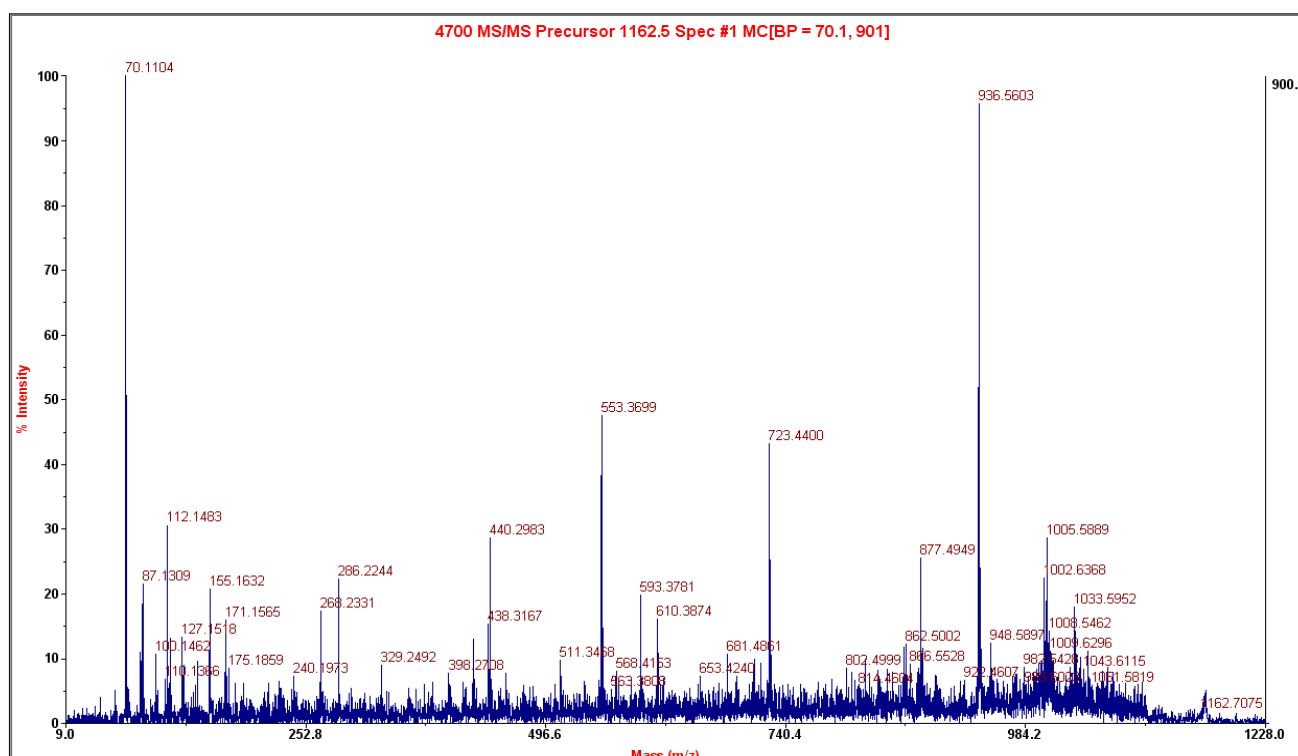


Figura 41: Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con m/z = 1162.5178 de la fracción P₄ perteneciente a *L. casei* 95.

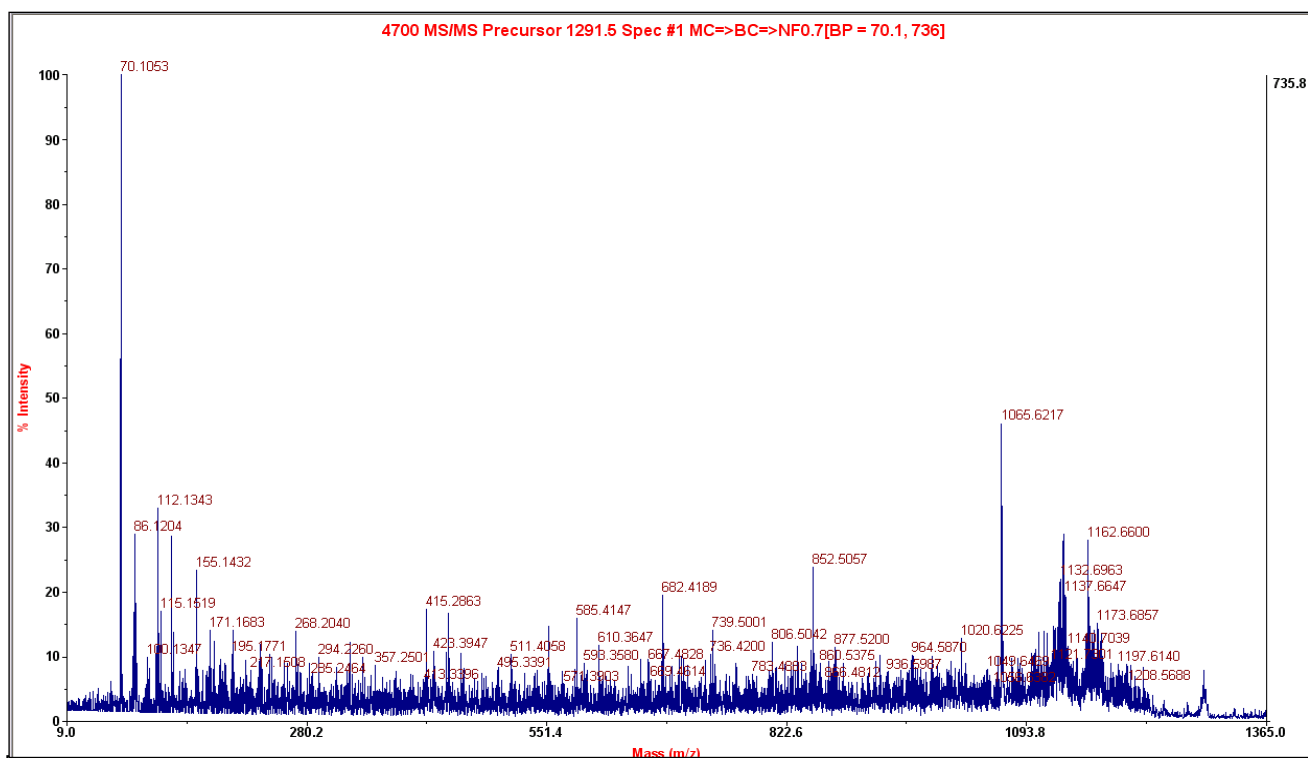


Figura 42: Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con $m/z = 1291.5745$ de la fracción P_4 perteneciente a *L. casei* 95.

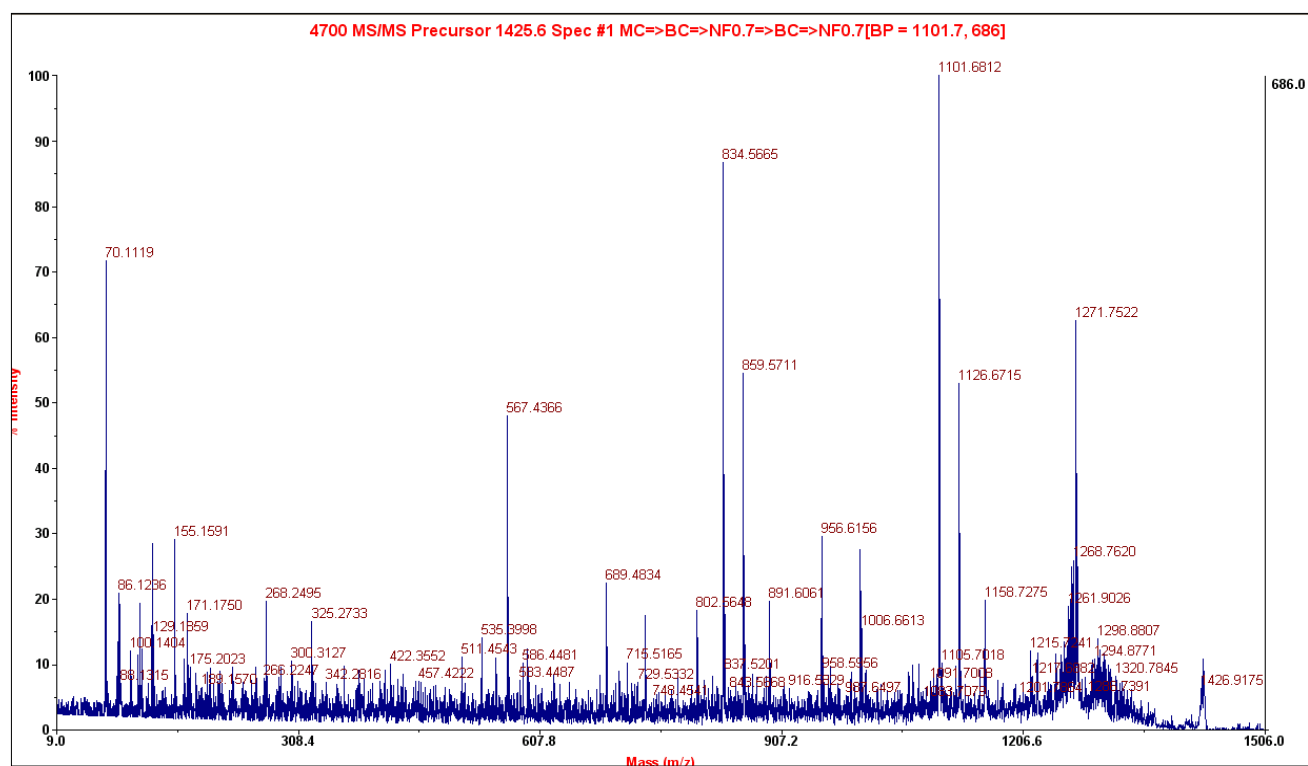


Figura 43: Espectro de fragmentación producido a partir de la señal con $m/z = 1425.6570$ de la fracción P_4 perteneciente a *L. casei* 95.

En base a todo lo discutido, la actividad bacteriocinogénica de *L. casei* 95 sugerida por los resultados presentados en la Tabla 10, podría deberse a un único péptido anticlostridial presente en la fracción P₄ ó dos bacteriocinas contenidas respectivamente en las fracciones P₁ y P₄.

En referencia a las fracciones de HPLC P₂ y P₄ de *L. casei* 26, no se obtuvieron los espectros de masa correspondientes a los compuestos inhibitorios presentes por lo que no fue posible caracterizarlos. Como se discutió en referencia a la fracción P₁ de la cepa 95, podría haber ocurrido que proteasas producidas por *L. casei* 26 hayan degradado los potenciales péptidos anticlostridiales presentes en las fracciones P₂ y P₄ de esta cepa. A pesar de esto, en la Tabla 10 se puede apreciar que el sobrenadante perteneciente a *L. casei* 26 neutralizado y tratado con proteinasa K redujo su actividad anticlostridial, lo que indicaría la existencia de al menos un compuesto de naturaleza peptídica. Además el sobrenadante de dicha cepa conservó su acción inhibitoria luego de los tratamientos térmicos, lo que sugiere que uno o más de los presuntos péptidos antimicrobianos serían termoestables. Por otra parte, la obtención de dos fracciones de HPLC con actividad anticlostridial (P₂ y P₄), hace suponer que *L. casei* 26 produciría dos bacteriocinas, las cuales serían termoestables dado que las fracciones P₂ y P₄ conservaron su acción inhibitoria luego de ser concentradas por rotaevaporación, proceso realizado a 70 °C durante 45 min. Teniendo en cuenta que la termoestabilidad es una característica de las bacteriocinas de clase I y II, los compuestos peptídicos de *L. casei* 26 pertenecerían a alguna de estas clases.

La falta de información estructural correspondiente a los compuestos inhibitorios producidos por la cepa 26 plantea la necesidad de optimizar el protocolo de extracción y purificación. También se podrían realizar metodologías dirigidas a la detección de compuestos antimicrobianos que en esta investigación no son considerados, por ejemplo compuestos volátiles, D-aminoácidos, entre otros.

4.8 Evaluación de la sensibilidad de *C. tyrobutyricum* a la nisina

En el estudio realizado para determinar la susceptibilidad de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 a la nisina (Fig. 44) se detectó inhibición a las tres concentraciones de nisina empleadas (2.5×10^{-2} , 2.5×10^{-3} y 2.5×10^{-4} mg/mL). En base a estos resultados y teniendo en cuenta la concentración máxima permitida de nisina en queso, se consideró la inhibición desarrollada por la concentración de 2.5×10^{-3} mg/mL para evaluar la actividad anticlostridial de las fracciones obtenidas por HPLC.

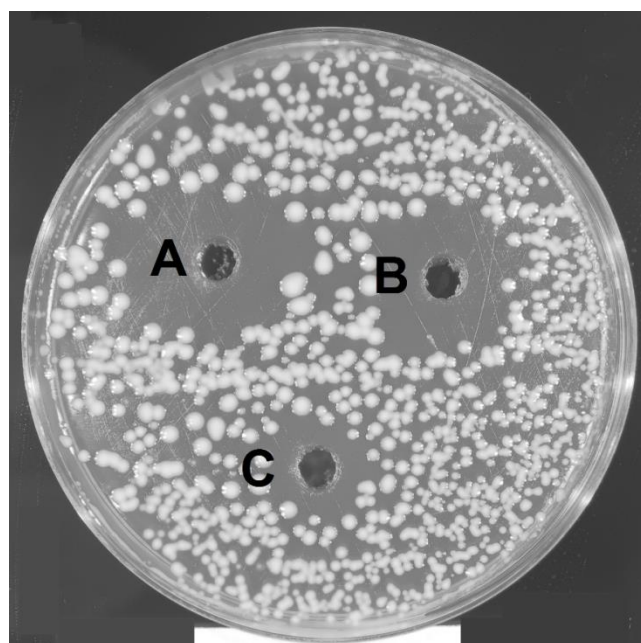
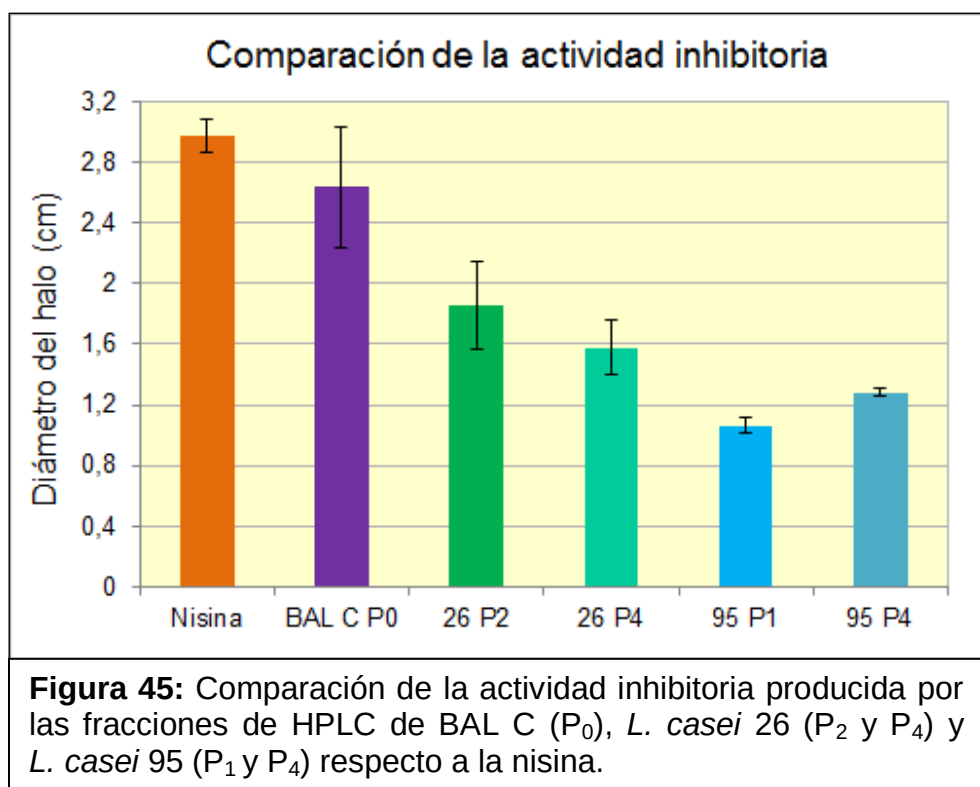


Figura 44: Acción inhibitoria de la nisina sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755. Se consideraron tres concentraciones (mg/mL) de la bacteriocina: 2.5×10^{-2} (A), 2.5×10^{-3} (B) y 2.5×10^{-4} (C).

4.9 Evaluación de la actividad anticlostridial de las fracciones eluidas

La actividad anticlostridial de las fracciones colectadas por RP-HPLC fue comparada con la generada por la nisina que se empleó como control positivo de inhibición. En la Figura 45 se observan los resultados obtenidos de promediar los diámetros correspondientes a los halos de inhibición producidos por la nisina y las fracciones de HPLC con acción bacteriocinogénica de las cepas BAL C, 26 y 95.



Se debe realizar algunas apreciaciones en referencia a la comparación de la actividad inhibitoria producida por las fracciones de HPLC respecto a la generada por la nisina. Hay poca similitud entre la solución de nisina, cuya concentración final es conocida y tiene alto grado de pureza, y las fracciones de HPLC evaluadas, en las cuales se desconoce la concentración de los metabolitos de interés y además existen otros compuestos disueltos en una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético. Estos factores pueden afectar la difusión de los compuestos antimicrobianos en el agar y por lo tanto el tamaño de los halos inhibitorios producidos (Lalpuria et al., 2012; Panda, 2012; Liu et al., 2016). Sin embargo, como la nisina es la única bacteriocina permitida como aditivo alimentario y tiene acción anticlostridial, se consideró pertinente incluirla en el estudio. Debido a las apreciaciones antes planteadas, los resultados obtenidos en este análisis sólo indican tendencias o probabilidades.

De acuerdo a los valores graficados y al análisis estadístico realizado, la fracción P₀ de BAL C habría presentado actividad inhibitoria similar a la nisina ($p > 0.05$), siendo ésta la que más inhibición produjo. Por otra parte, las fracciones P₂ y P₄ de *L. casei* 26 ejercieron niveles de inhibición estadísticamente similares entre sí y fueron mayores a los producidos por las fracciones P₁ y P₄ de *L. casei* 95 ($p < 0.05$). En el caso de *L. casei* 95 la fracción P₄ presentó mayor actividad antimicrobiana que la P₁ ($p < 0.05$), siendo esta última fracción la que tuvo menor acción inhibitoria de todas las evaluadas.

Debe aclararse que la actividad anticlostridial de cada fracción depende de la concentración de bacteriocina que presenta, la cual es difícil de determinar por la presencia de otros compuestos como péptidos y proteínas provenientes del medio de cultivo y del metabolismo bacteriano (Sharma et al., 2016; Johnson et al., 2017). Las técnicas de extracción y purificación empleadas en esta investigación fueron capaces de reducir la presencia de otras sustancias en las fracciones de interés, pero como se

comentó en referencia al espectro de masa correspondiente a la fracción P₀ de *L. casei* BAL C, la concentración de los compuestos contaminantes podría ser importante.

4.10 Determinación de la sensibilidad de cepas LAB y NSLAB a lisozima

Las cepas *L. casei* 26, *L. casei* 95 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 fueron cultivadas en tubos de caldo MRS adicionados con lisozima a concentración final 1 mg/mL así como en las diluciones decimales seriadas de lisozima realizadas con el mismo medio de cultivo para determinar la sensibilidad de estos aislamientos a la lisozima y la compatibilidad de los mismos con dicho preservante químico que es comúnmente empleado por la industria quesera para prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía. Como se aprecia en la Figura 46 las cepas de BAL en estudio presentaron crecimiento a las distintas concentraciones de lisozima consideradas. En consecuencia ninguno de los tratamientos con lisozima afectó la viabilidad de las cepas de BAL evaluadas.

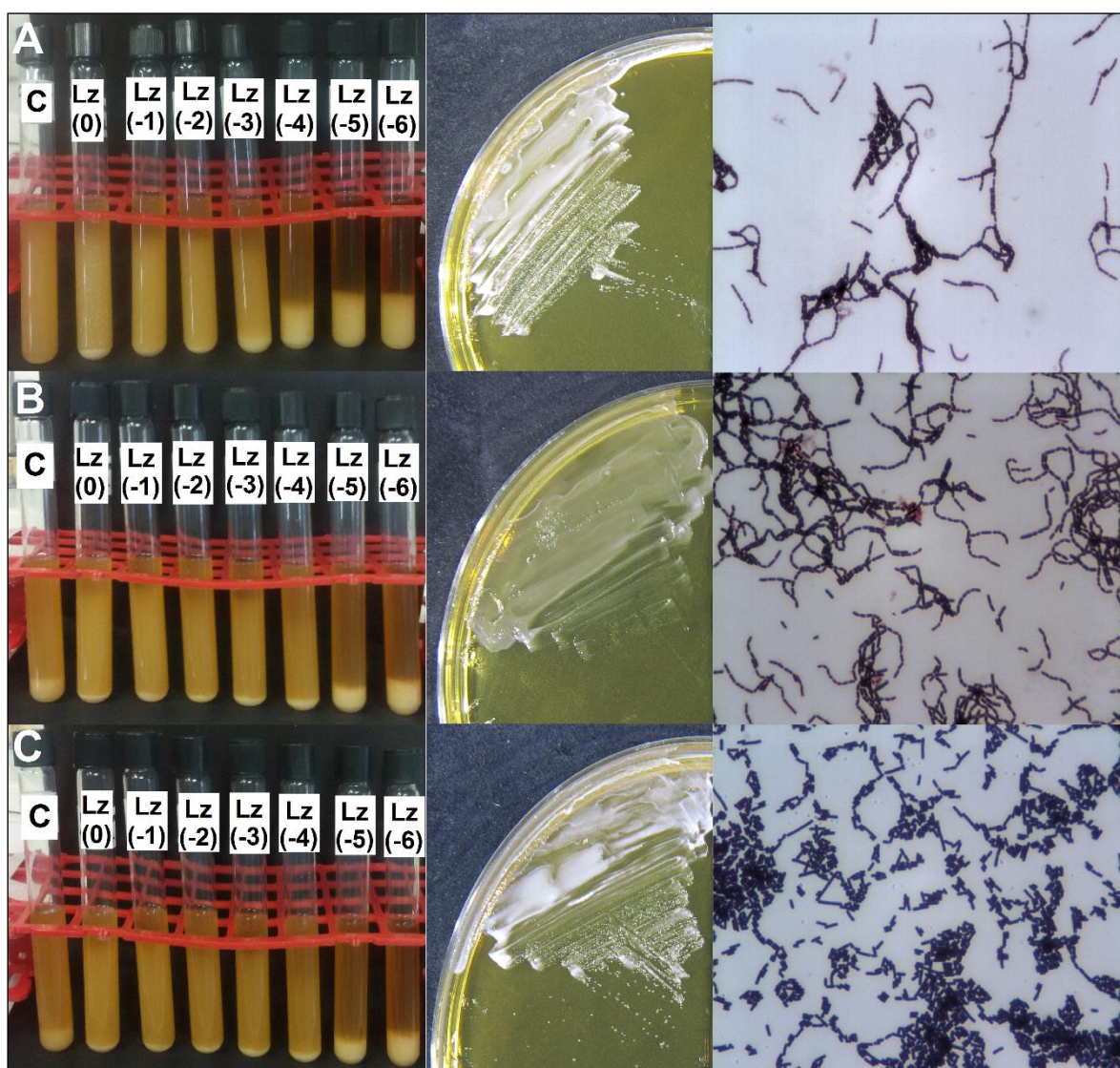


Figura 46: Crecimiento de las cepas 26 (Fig. A), 95 (Fig. B) y 76 (Fig. C) en tubos de caldo MRS adicionado con lisozima (Lz). Lz (0) correspondió al tubo con 1,0 mg/mL de lisozima. Las diluciones decimales realizadas comprenden los tubos Lz (-1) a Lz (-6). El tubo C fue el control positivo de crecimiento (caldo MRS sin lisozima). También se muestra el crecimiento en placas sembradas a partir de los tubos Lz (0) y las tinciones de Gram de colonias aisladas.

También se analizó la sensibilidad de las cepas de BAL a mayores concentraciones de lisozima mediante el método de difusión en agar (Fig. 47). Los resultados encontrados fueron similares a los obtenidos en el estudio previo.

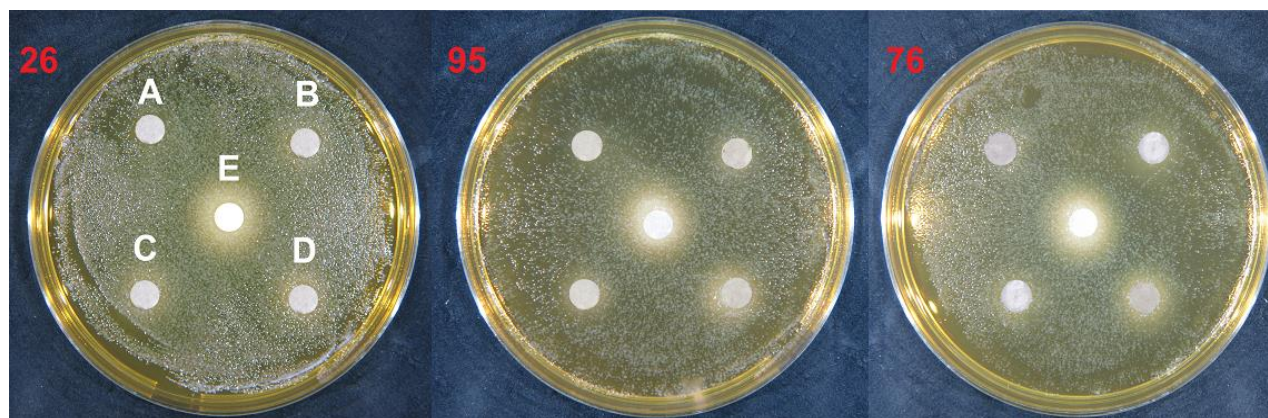


Figura 47: Evaluación en placa de la sensibilidad de las cepas 26, 95 y 76 a la lisozima a concentraciones: 1.88 mg/mL (A), 3.75mg/mL (B), 5.00 mg/mL (C), 7.50 mg/mL (D) y 15.00 mg/mL (E). El orden de sembrado de las soluciones de lisozima en las placas de las cepas 95 y 76 fue el mismo que el indicado en la placa del aislamiento 26.

Según los análisis realizados las cepas en estudio son lisozima-resistentes a las concentraciones empleadas en la producción quesera. Cabe mencionar respecto a esta determinación que varios investigadores han notificado la presencia de cepas LAB y NSLAB lisozima-resistentes en quesos, probablemente debido a que la lisozima actúa como un factor de selección que favorece la proliferación de las bacterias compatibles con esta enzima (Brändle et al., 2016). Según D'Amato et al. (2010) la concentración a la cual la lisozima es frecuentemente adicionada a la leche para la elaboración quesera (20 a 35 mg/L de leche), que equivale a niveles de 200 a 400 mg de lisozima/Kg de queso, usualmente no inhibe a las cepas empleadas en el cultivo starter.

El trabajo realizado por Soggiu et al. (2016) comparó el impacto de la lisozima en la diversidad de *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. y otros grupos bacterianos no pertenecientes a LAB presentes en quesos Grana Padano con bajos y elevados niveles de esporas de *Clostridium* spp.. En ambas situaciones se constató que la lisozima redujo la diversidad en *Lactobacillus* spp., mientras que en los restantes géneros el efecto no fue significativo.

La existencia de tolerancia a lisozima en los aislamientos evaluados coincide con otras investigaciones que han reportado esta característica en cepas de *L. delbrueckii* y del Grupo *L. casei* (D'Incecco et al., 2016). Muchos de los trabajos concuerdan en que la resistencia a la lisozima en las BAL varía a nivel de especie o cepa, pero de forma general suele ser mayor en los géneros cuya morfología celular es cocoide en lugar de bastón. Asimismo, dentro de *Lactobacillus* las especies heterofermentativas mesófilas, por ejemplo *L. casei*, son frecuentemente más resistentes que las especies termófilas (Carminati et al., 2014; Aspri et al., 2016).

4.11 Evaluación de la acción anticlostridial de la lisozima

El estudio de la actividad anticlostridial de la lisozima realizado en placas de agar RCM contra *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 evidenció halos de inhibición para todas las concentraciones de lisozima evaluadas. La Figura 48 corresponde a una placa perteneciente a este análisis, como se puede apreciar el efecto inhibitorio aumentó con la concentración de lisozima.

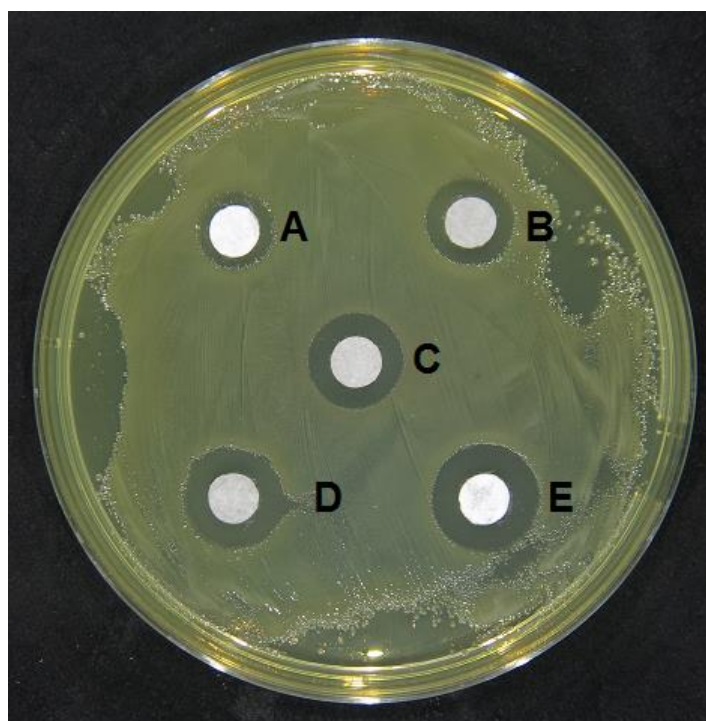


Figura 48: Inhibición de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 por lisozima en placa de agar RCM. Las concentraciones de lisozima testeadas fueron: 0.05 mg/mL (A), 0.10 mg/mL (B), 0.5 mg/mL (C), 1.0 mg/mL (D) y 1.5 mg/mL (E).

Los resultados obtenidos son consistentes con los presentados por Ávila et al. (2014). En dicho estudio se evaluó la sensibilidad de células vegetativas y esporas de *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* a distintas concentraciones de lisozima. Si bien la susceptibilidad a la lisozima fue cepa-dependiente para las cuatro especies consideradas, se determinó que *C. tyrobutyricum* fue la más sensible a este compuesto. Los valores de MIC a los cuales las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* fueron inhibidas se encontraron entre <0.20 y $12.50 \mu\text{g/mL}$, mientras que las esporas exhibieron valores de MIC en el rango de 1.57 a $400 \mu\text{g/mL}$. Nótese que la concentración de lisozima usualmente empleada en queso es superior a estos valores (200 a 400 mg/Kg de queso). Sin embargo, como la sensibilidad a este preservante varía a nivel de cepa, existen casos de hinchazón tardía a dicha concentración (D'Amato et al., 2010).

4.12 Comparación de la acción anticlostridial de los sobrenadantes de cepas LAB y NSLAB respecto a la lisozima y en combinación con ésta.

La actividad inhibitoria desarrollada por los sobrenadantes sin neutralizar de los aislamientos 26, 95 y 76, fue comparada mediante el método de difusión en agar RCM con la producida por la lisozima, los sobrenadantes de dichas cepas adicionados con lisozima y el sobrenadante no neutralizado de la cepa comercial BAL C (Fig. 49).

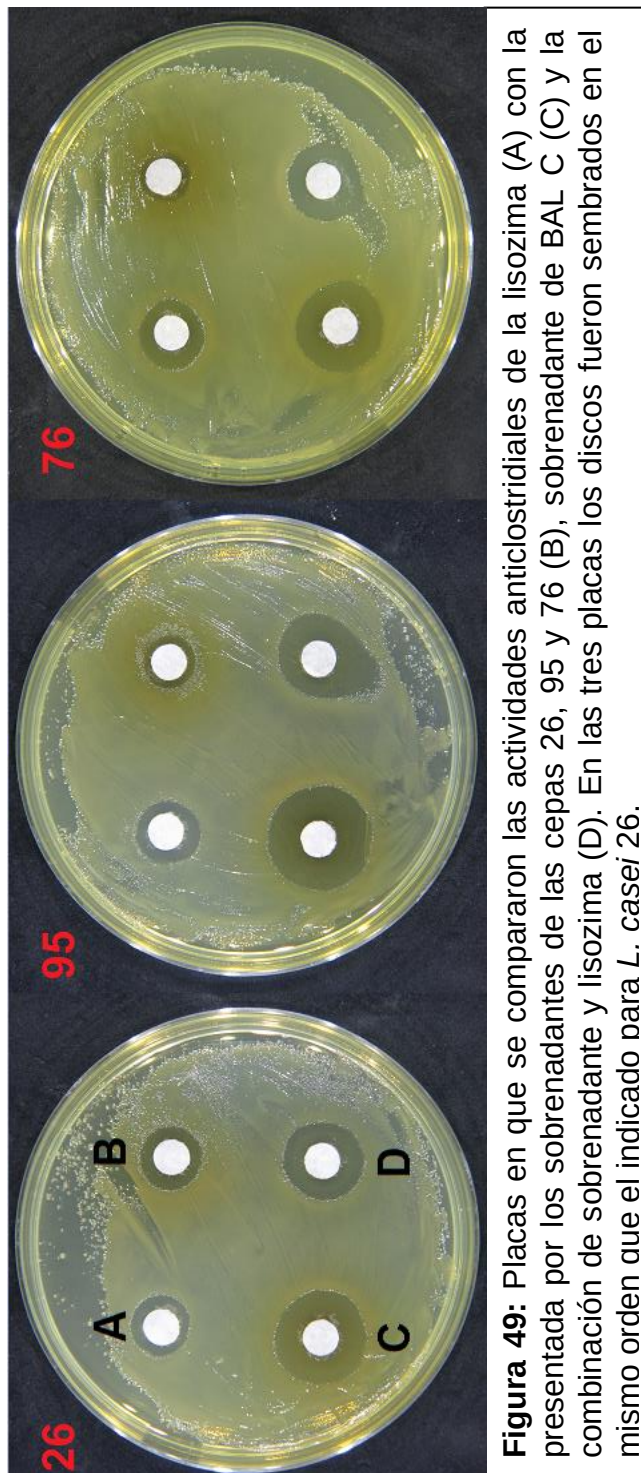


Figura 49: Placas en que se compararon las actividades anticlostridiales de la lisozima (A) con la presentada por los sobrenadantes de las cepas 26, 95 y 76 (B), sobrenadante de BAL C (C) y la combinación de sobrenadante y lisozima (D). En las tres placas los discos fueron sembrados en el mismo orden que el indicado para *L. casei* 26.

En la Figura 50 se compararon para cada aislamiento de BAL en estudio los resultados obtenidos en este análisis (diámetro de los halos de inhibición).

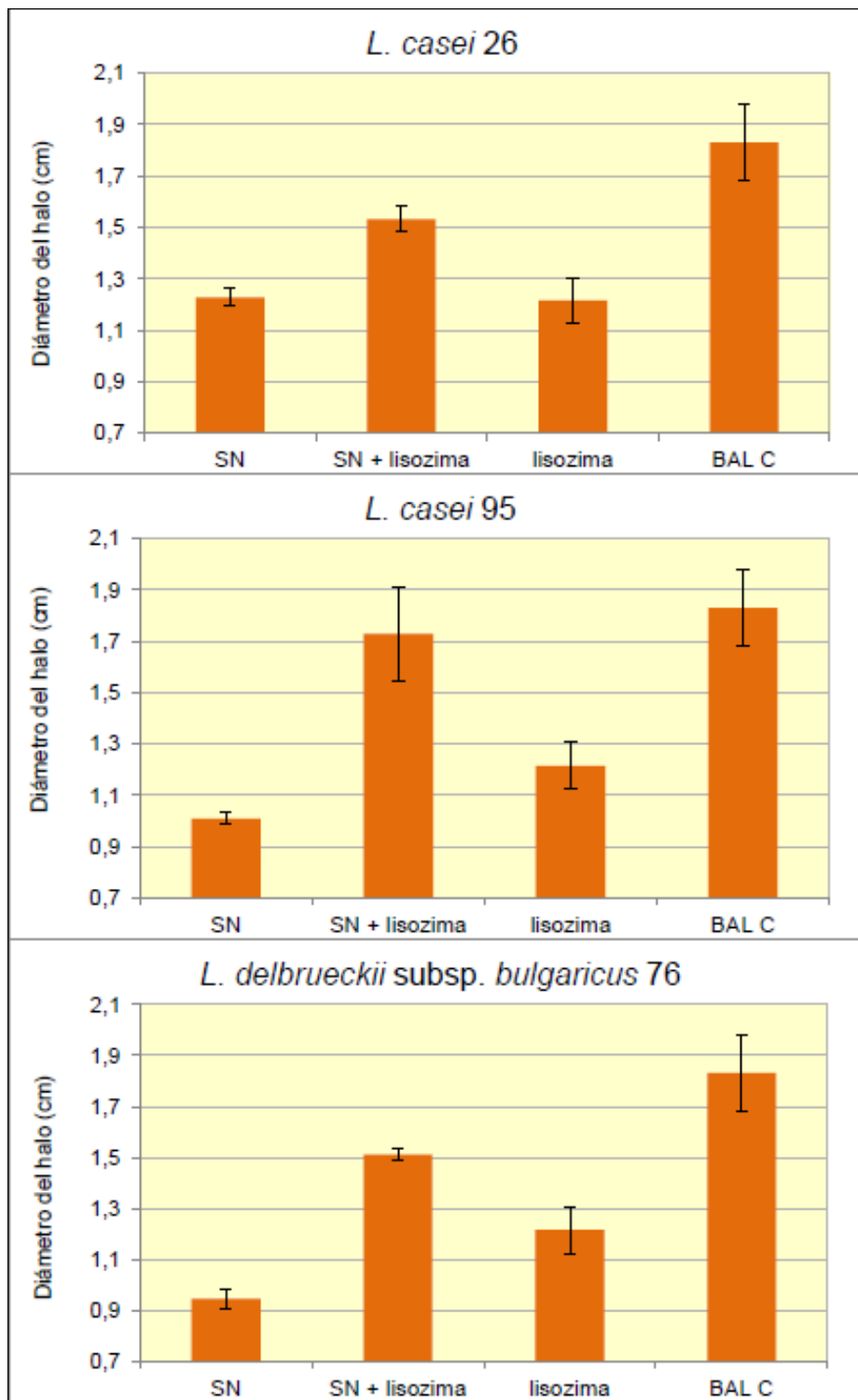


Figura 50: Comparación del diámetro de los halos de inhibición producidos por: sobrenadantes de las cepas 26, 95, 76 y BAL C, solución de lisozima (0.75mg/mL) y mezcla de lisozima con los sobrenadantes de las cepas 26, 95 y 76. El microorganismo indicador de inhibición fue *C. tyrobutyricum* ATCC 25755.

Según los resultados obtenidos y los análisis estadísticos realizados BAL C presentó mayor acción anticlostridial que las cepas restantes, la lisozima y las mezclas de los sobrenadantes con dicha enzima, con excepción de la combinación del sobrenadante de la cepa 95 con lisozima, cuya actividad antimicrobiana fue similar a BAL C ($p>0.05$). Estadísticamente se pudo determinar que los sobrenadantes de las cepas 76 y 95 inhibieron de manera comparable ($p>0.05$). Con respecto a la inhibición generada por la solución de lisozima fue similar a la desarrollada por *L. casei* 26 ($p>0.05$), pero superior a la producida por *L. casei* 95 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 ($p<0.05$). Por otro lado, la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de las cepas 26, 76 y 95 adicionados con lisozima fue semejante ($p>0.05$). Además la combinación de lisozima con cada uno de los sobrenadantes de los aislamientos presentó acción anticlostridial mayor que la lisozima y el sobrenadante por separado ($p<0.05$). La presencia de mayor inhibición en las mezclas de sobrenadantes con lisozima podría deberse a la existencia de sinergismo entre los compuestos inhibitorios sintetizados por las cepas de BAL y la lisozima.

De acuerdo a la literatura las bacteriocinas pueden emplearse en sistemas de barreras alimentarias con otras sustancias antimicrobianas produciéndose un efecto sinérgico entre ambas sustancias que aumenta el poder inhibitorio, con la posibilidad de extenderse a otros microorganismos (Egan et al., 2016). Específicamente existen ejemplos de combinaciones de bacteriocinas con lisozima que muestran un efecto sinérgico, el más conocido es la mezcla nisina con lisozima. La hipótesis que se ha planteado para el sinergismo existente es que la lisozima rompe la pared bacteriana permitiendo mayor acceso a las bacteriocinas o facilitando la interacción de éstas con sus receptores de membrana (Grande et al., 2011; Maliničová et al., 2011; Cabrefiga y Montesinos, 2017; Hernandez et al., 2017). Por otra parte, también hay trabajos científicos que respaldan la existencia de efecto sinérgico entre el peróxido de hidrógeno y la lisozima (Losso et al., 2000; Roller y Board, 2011; AGERA, 2014). Según Bukharin y Sgibnev (2013), el peróxido de hidrógeno modifica a la lisozima generando metabolitos que aumentan la actividad bactericida de esta enzima.

5. Conclusión y perspectivas futuras

En la investigación realizada se pudieron aislar 130 cepas de BAL. De las cuales, 56 presentaron actividad antibacteriana sobre *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, que consistieron en ocho cepas LAB mayoritariamente aisladas de leche y 48 cepas NSLAB obtenidas principalmente de muestras de queso. Siete aislamientos fueron seleccionados para determinar sus mecanismos de inhibición por presentar la máxima capacidad anticlostridial. En cuatro de los aislamientos de BAL seleccionados (cepas 23, 24, 29 y 104) la actividad inhibitoria se debió a la producción de acidez.

En los restantes aislamientos *L. casei* 26 aislada de queso, *L. casei* 95 proveniente de leche cruda y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 obtenida de leche cruda, los mecanismos anticlostridiales involucraron la generación de acidez y otros metabolitos inhibitorios. En el caso de las cepas 26 y 95 de *L. casei* la actividad anticlostridial obedecería a la producción de acidez, peróxido de hidrógeno y una potencial bacteriocina, mientras que la acción inhibitoria de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 se debería a la acidez y al peróxido de hidrógeno.

Los sobrenadantes de las cepas 26, 76 y 95 inhibieron la totalidad de las cepas analizadas de *Clostridium* autóctonas de productos lácteos responsables del defecto de hinchazón tardía en quesos, sin embargo, existieron diferencias en el grado de susceptibilidad de cada una de las especies de *Clostridium*. La sensibilidad de *C. tyrobutyricum* a los sobrenadantes de las cepas 26 y BAL C fue especie-dependiente ($p>0.05$), pero varió a nivel de cepa ante los sobrenadantes de las cepas 95 y 76 ($p<0.05$). La inhibición de *C. butyricum* fue especie-dependiente para los sobrenadantes de las cuatro cepas de BAL evaluadas ($p>0.05$). En *C. sporogenes*, la inhibición producida por los sobrenadantes de las cepas 76 y BAL C fue especie-dependiente ($p>0.05$), mientras que la generada por los sobrenadantes de las cepas 26 y 95 fue cepa-dependiente ($p<0.05$). La sensibilidad de *C. beijerinckii* a las cuatro cepas de BAL varió a nivel de cepa ($p<0.05$).

De los sobrenadantes evaluados, el correspondiente a la cepa 95 habría generado la mayor actividad inhibitoria contra *C. tyrobutyricum* siendo seguido por los sobrenadantes de BAL C y la cepa 26. Con respecto a *C. sporogenes*, los sobrenadantes que presentaron mayor acción antimicrobiana fueron los pertenecientes a las cepas 95 y 26, mientras que los sobrenadantes de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 y *L. casei* BAL C tuvieron menor acción inhibitoria sobre esta especie y fueron similares entre sí. En relación a *C. butyricum* y *C. beijerinckii*, la máxima capacidad inhibitoria se debería al sobrenadante de *L. casei* BAL C, siguiendo en orden de importancia los sobrenadantes de los aislamientos 26 y 95. En referencia al sobrenadante de *L. casei* subsp. *bulgaricus* 76, éste generaría la menor acción antimicrobiana sobre *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*.

Se determinó que las cepas de BAL analizadas fueron resistentes a la lisozima en el rango de concentraciones consideradas, por lo que no serían afectadas por los niveles de lisozima presentes en quesos. Al comparar la acción anticlostridial de los sobrenadantes de los aislamientos 26, 76 y 95 con la producida por el sobrenadante de BAL C y la lisozima, se detectó que la cepa comercial y la lisozima tuvieron mayor actividad anticlostridial que los sobrenadantes de las cepas estudiadas, excepto en el caso del

sobrenadante de *L. casei* 26 cuya actividad inhibitoria sería similar a la presentada por la lisozima. Para las tres cepas de BAL evaluadas la mezcla de sus respectivos sobrenadantes con lisozima presentó mayor acción anticlostridial que los sobrenadantes y la solución de lisozima por separado, esto podría deberse a la existencia de sinergismo entre uno o más de los metabolitos antibacterianos producidos por las cepas BAL y la lisozima.

Con respecto a los péptidos anticlostridiales presentes en los sobrenadantes de las cepas 26 y 95, fueron compuestos termoestables, pudiendo ser bacteriocinas de las clases I o II. También se pudo determinar que cada una de estas cepas sintetiza al menos dos posibles bacteriocinas correspondientes a las fracciones de HPLC obtenidas: P₂ y P₄ de *L. casei* 26, así como P₁ y P₄ de *L. casei* 95. En *L. casei* (95) por espectrometría de masas se obtuvo el peso molecular de una de las presuntas bacteriocinas producidas presente en la fracción P₄ (1162.52 Da), aunque podría ser parte de un compuesto de mayor peso molecular.

El análisis comparativo de la actividad inhibitoria producida por las fracciones de HPLC de las cepas evaluadas, respecto a la nisina y la fracción eluida (P₀) perteneciente a BAL C, sugirió que la nisina y el compuesto anticlostridial producido por BAL C generarían mayor inhibición que las fracciones estudiadas. Asimismo, las fracciones pertenecientes a *L. casei* 26 presentarían más actividad anticlostridial que las correspondientes a *L. casei* 95.

En este trabajo se lograron aislar cepas anticlostridiales de LAB y NSLAB autóctonas de lácteos y postular los posibles mecanismos antimicrobianos ejercidos.

Con la finalidad de determinar la utilidad de las cepas de LAB y NSLAB seleccionadas en la elaboración quesera, se debería estudiar la compatibilidad de las mismas con los fermentos utilizados rutinariamente en la industria láctea.

Es importante señalar que los resultados obtenidos en relación al análisis de los péptidos antimicrobianos identificados plantean la necesidad de continuar su caracterización estructural y fisicoquímica en próximos trabajos.

Es necesario realizar futuros estudios para evaluar la acción inhibitoria de las cepas aisladas y sus metabolitos purificados sobre otros microorganismos contaminantes presentes en leche y quesos. También sería interesante evidenciar la existencia de otros compuestos inhibitorios no considerados en este trabajo y analizar a nivel de quesos elaborados en plantas a escala piloto la efectividad de la acción anticlostridial producida por estos aislamientos.

6. Anexos

Anexo 1

Identificación por secuenciación del gen del ARNr 16S de los aislamientos de BAL con actividad anticlostridial, se incluye la cepa BAL C de origen comercial.

Tabla 15: Identificación de cepas LAB y NSLAB por secuenciación del gen del ARNr 16S			
Cepa	Identificación y % de identidad	Secuencia con mayor % de identidad	ID de la secuencia
BAL C	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain BN1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij944551914 KT963021.1
1	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain CAU9542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1304837783 MF108221.1
2	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain PLC23B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1485350954 MK007081.1
3	<i>L. rhamnosus</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain V5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1433390942 MG209517.1
7	<i>L. casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain 56.5 E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1477741236 MH926054.1
9	<i>L. paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain 4G330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1487193463 MK026811.1
11	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain 56.5 E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1477741236 MH926054.1
13	<i>L. paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain NWAUFU1353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1279336671 MG551015.1
15	<i>L. rhamnosus/paracasei/casei</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain 6870 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	gij1477820344 MH791026.3
17	<i>L. rhamnosus</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1469258005 MH828364.1
18	<i>L. rhamnosus</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG chromosome, complete genome	gij1440885403 CP031290.1
23	<i>S. macedonicus</i> 99%	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain S43E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1448246086 MH748282.1
24	<i>S. macedonicus</i> 99%	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain HBUAS54123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1438168114 MH701913.1

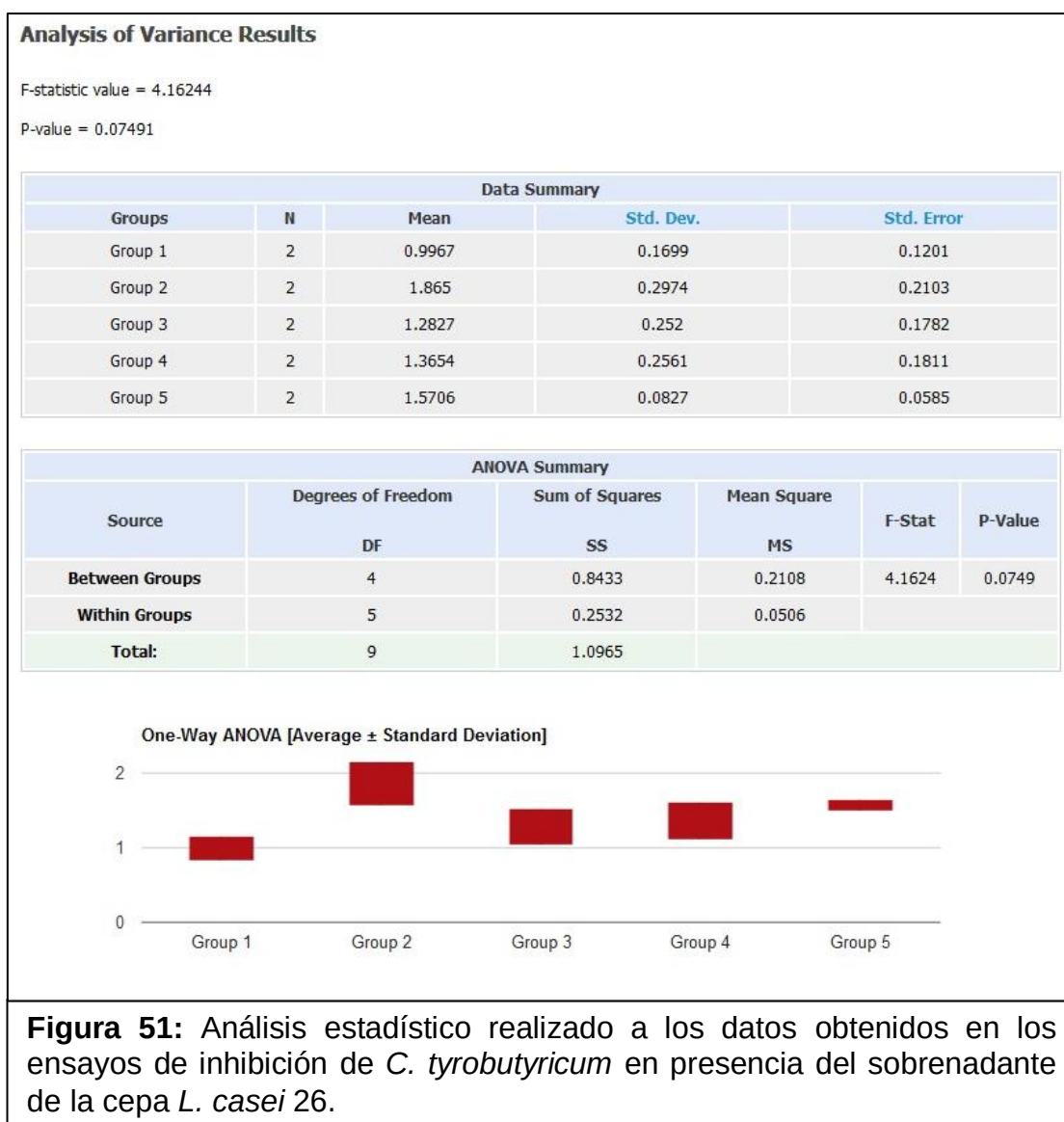
Tabla 15: Identificación de cepas LAB y NSLAB por secuenciación del gen del ARNr 16S (continuación)			
Cepa	Identificación y % de identidad	Secuencia con mayor % de identidad	ID de la secuencia
26	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain BN1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil944551914 KT963021.1
27	<i>L. rhamnosus/casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain 6870 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	gil1477820344 MH791026.3
29	<i>L. casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain 4G330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1487193463 MK026811.1
32	<i>L. rhamnosus</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG chromosome, complete genome	gil1440885403 CP031290.1
33	<i>L. rhamnosus</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain 6870 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	gil1477820344 MH791026.3
34	<i>L. rhamnosus</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain V5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1433390942 MG209517.1
35	<i>L. paracasei</i> 98%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain NWAUFU1353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1279336671 MG551015.1
36	<i>L. rhamnosus/casei</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG chromosome, complete genome	gil1440885403 CP031290.1
42	<i>L. rhamnosus/casei</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain V5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1433390942 MG209517.1
49	<i>L. lactis subsp. lactis</i> 99%	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CE1.9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1476026126 MH899237.1
50	<i>E. faecalis</i> 100%	<i>Enterococcus faecalis</i> strain YN771 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1477053874 MH919370.1
51	<i>L. helveticus</i> 99%	<i>Lactobacillus helveticus</i> H10, complete genome	gil323465557 CP002429.1
52	<i>L. casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain PLC23B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1485350954 MK007081.1
55	<i>L. fermentum</i> 100%	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SK434 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gil1482201539 MH973189.1

Tabla 15: Identificación de cepas LAB y NSLAB por secuenciación del gen del ARNr 16S (continuación)			
Cepa	Identificación y % de identidad	Secuencia con mayor % de identidad	ID de la secuencia
57	<i>L. rhamnosus/casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain 6870 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	gij1477820344 MH791026.3
58	<i>L. rhamnosus</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1469258005 MH828364.1
59	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain CAU9542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1304837783 MF108221.1
60	<i>L. buchneri</i> 100%	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain NB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1020994327 KX010096.1
61	<i>L. paracasei/casei</i> 99%	<i>Lactobacillus casei</i> strain S49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1488073293 MK033992.1
62	<i>L. paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ZFM54 chromosome, complete genome	gij1487562324 CP032637.1
76	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 100%	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> strain PLJ27A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1408623710 MH518297.1
77	<i>L. rhamnosus/casei/paracasei</i> 99%	<i>Lactobacillus casei</i> strain P3-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1486894171 MK024221.1
79	<i>L. rhamnosus/paracasei</i> 99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1469258005 MH828364.1
83	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus/lactis</i> 99%	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> isolate <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1 genome assembly, chromosome: I	gij14428386090 LS991409.1
86	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 99%	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain Pla27C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1407720523 MH511808.1
94	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 99%	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain CAU10207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1304837431 MF098202.1
95	<i>L. casei</i> 99%	<i>Lactobacillus casei</i> strain BN1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij944551914 KT963021.1
97	<i>E. faecalis</i> 99%	<i>Enterococcus faecalis</i> strain S40E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1468561254 MH820032.1
100	<i>L. casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain CQ70-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gij1434112987 MG646807.1

Tabla 15: Identificación de cepas LAB y NSLAB por secuenciación del gen del ARNr 16S (continuación)			
Cepa	Identificación y % de identidad	Secuencia con mayor % de identidad	ID de la secuencia
101	<i>L. casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain BN1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 944551914 KT963021.1
104	<i>L. rhamnosus</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain 4G330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1487193463 MK026811.1
105	<i>P. pentosaceus</i> 100%	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain FB181 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1241299186 MF945627.1
107	<i>L. paracasei/casei</i> 100%	<i>Lactobacillus casei</i> strain P3-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1486894171 MK024221.1
108	<i>P. pentosaceus</i> 100%	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1480117737 MH229959.1
109	<i>L. casei/paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain CQ70-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1434112987 MG646807.1
110	<i>P. pentosaceus</i> 100%	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain SK337 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1482201535 MH973185.1
111	<i>L. salivarius</i> 100%	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain HBUAS54250 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1465947297 MH817702.1
114	<i>S. macedonicus</i> 99%	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain CN2121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 944551912 KT963019.1
116	<i>L. casei</i> 99%	<i>Lactobacillus casei</i> strain CAU9542 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1304837783 MF108221.1
119	<i>E. faecalis</i> 100%	<i>Enterococcus faecalis</i> strain SN11-6-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1434113299 MG694649.1
121	<i>L. paracasei</i> 99%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ZFM54 chromosome, complete genome	gi 1487562324 CP032637.1
122	<i>L. casei/paracasei</i> 99%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain CQ70-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1434112987 MG646807.1
125	<i>L. paracasei</i> 100%	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain NWAUFU1353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1279336671 MG551015.1
126	<i>S. macedonicus</i> 99%	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain S43E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	gi 1448246086 MH748282.1

Anexo 2.1

Análisis One-Way ANOVA de los datos presentados en la Figura 31 y 32 para determinar si el efecto inhibitorio presentado por las cepas de cada especie de *Clostridium* fue especie o cepa-dependiente ($p < 0.05$). En todos los análisis cada grupo corresponde a una cepa de *Clostridium*.



Analysis of Variance Results

F-statistic value = 2.80252

P-value = 0.14419

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.84	0.032	0.0226
Group 2	2	1.6391	0.0915	0.0647
Group 3	2	1.732	0.0523	0.037
Group 4	2	1.78	0.0891	0.063
Group 5	2	1.6451	0.082	0.058

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.0601	0.015	2.8025	0.1442
Within Groups	5	0.0268	0.0054		
Total:	9	0.0869			

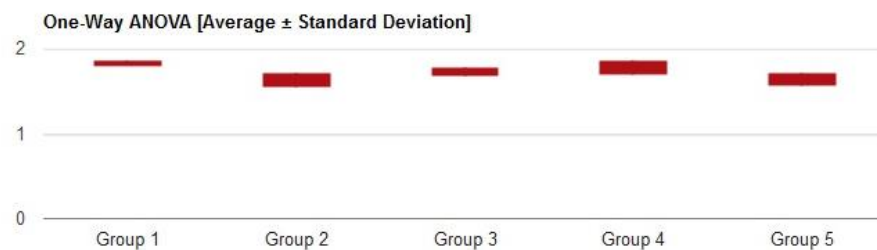


Figura 52: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. butyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 26.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 8.55314

P-value = 0.01847

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.19	0.1915	0.1354
Group 2	2	1.0793	0.1375	0.0973
Group 3	2	1.7009	0.0828	0.0585
Group 4	2	1.322	0.022	0.0156
Group 5	2	1.5304	0.1068	0.0755

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.5086	0.1271	8.5531	0.0185
Within Groups	5	0.0743	0.0149		
Total:	9	0.5829			



Figura 53: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. beijerinckii* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 26.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 7.26864

P-value = 0.02584

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.6837	0.0264	0.0186
Group 2	2	1.02	0.0493	0.0348
Group 3	2	1.2742	0.3365	0.238
Group 4	2	1.7015	0.0373	0.0264
Group 5	2	1.0969	0.1564	0.1106

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.8269	0.2067	7.2686	0.0258
Within Groups	5	0.1422	0.0284		
Total:	9	0.9692			



Figura 54: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. sporogenes* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 26.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 6.64488

P-value = 0.03096

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.3055	0.0841	0.0595
Group 2	2	1.692	0.2321	0.1641
Group 3	2	1.0585	0.0871	0.0616
Group 4	2	1.2674	0.0988	0.0699
Group 5	2	1.3698	0.03	0.0212

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.421	0.1052	6.6449	0.031
Within Groups	5	0.0792	0.0158		
Total:	9	0.5002			



Figura 55: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. tyrobutyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 3.93889

P-value = 0.08254

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.4546	0.0625	0.0442
Group 2	2	1.6513	0.0704	0.0498
Group 3	2	1.4938	0.0894	0.0632
Group 4	2	1.5123	0.0356	0.0252
Group 5	2	1.4237	0.037	0.0262

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.0614	0.0154	3.9389	0.0825
Within Groups	5	0.0195	0.0039		
Total:	9	0.0809			

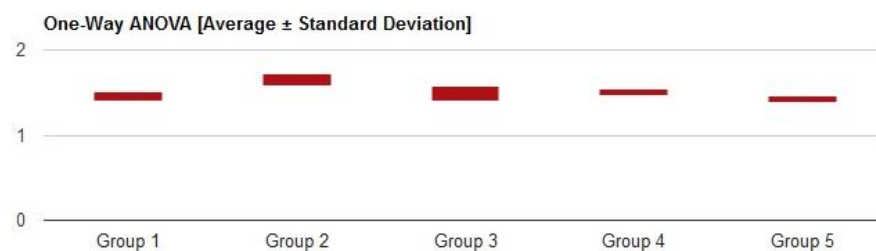


Figura 56: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. butyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 16.97512

P-value = 0.0041

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	0.957	0.0658	0.0465
Group 2	2	1.0126	0.0353	0.025
Group 3	2	1.4837	0.099	0.07
Group 4	2	1.2108	0.1075	0.076
Group 5	2	1.0085	0.0324	0.0229

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.38	0.095	16.9751	0.0041
Within Groups	5	0.028	0.0056		
Total:	9	0.408			

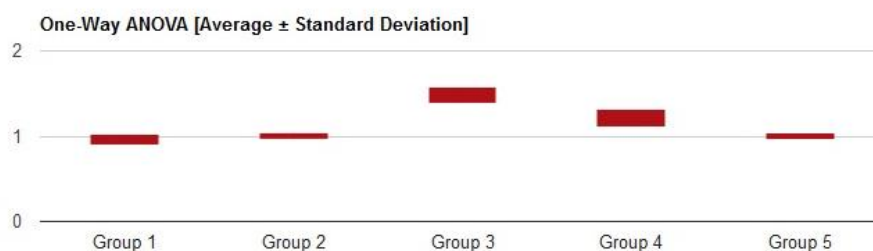


Figura 57: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. beijerinckii* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 4.16968

P-value = 0.07468

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.4261	0.0439	0.031
Group 2	2	1.093	0.1067	0.0754
Group 3	2	1.2311	0.0642	0.0454
Group 4	2	1.1512	0.0368	0.026
Group 5	2	1.1008	0.1632	0.1154

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.1515	0.0379	4.1697	0.0747
Within Groups	5	0.0454	0.0091		
Total:	9	0.1969			

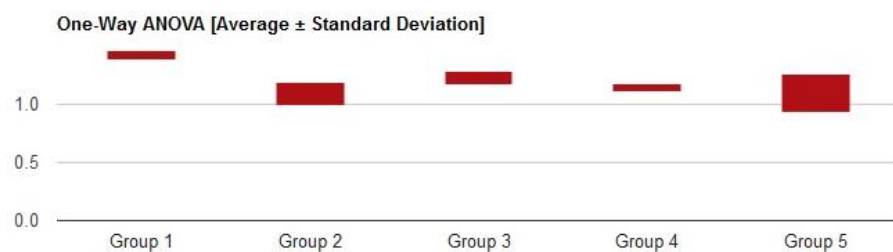


Figura 58: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. sporogenes* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 19.64065

P-value = 0.00293

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.148	0.2116	0.1496
Group 2	2	2.0237	0.0538	0.0381
Group 3	2	1.0965	0.1768	0.125
Group 4	2	1.8753	0.0763	0.0539
Group 5	2	1.4268	0.0717	0.0507

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	1.4124	0.3531	19.6407	0.0029
Within Groups	5	0.0899	0.018		
Total:	9	1.5023			



Figura 59: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. tyrobutyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 95.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 4.67155

P-value = 0.06085

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.7632	0.1037	0.0733
Group 2	2	1.3923	0.1638	0.1158
Group 3	2	1.5105	0.048	0.0339
Group 4	2	1.621	0.0337	0.0238
Group 5	2	1.4328	0.086	0.0608

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.181	0.0452	4.6715	0.0609
Within Groups	5	0.0484	0.0097		
Total:	9	0.2294			

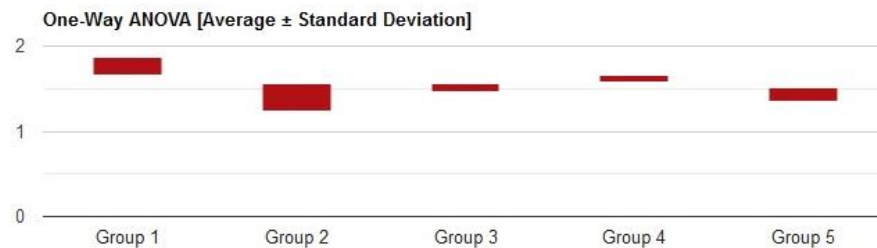


Figura 60: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. butyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 95.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 7.97197

P-value = 0.02138

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.0195	0.1429	0.101
Group 2	2	0.9752	0.0299	0.0212
Group 3	2	1.44	0.1743	0.1232
Group 4	2	0.9963	0.0257	0.0182
Group 5	2	1.2635	0.014	0.0099

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.3352	0.0838	7.972	0.0214
Within Groups	5	0.0526	0.0105		
Total:	9	0.3877			

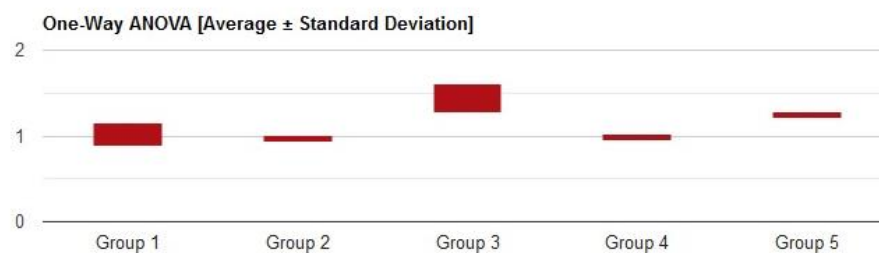


Figura 61: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. beijerinckii* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 95.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 60.73857

P-value = 0.0002

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.7151	0.0945	0.0668
Group 2	2	0.9226	0.049	0.0346
Group 3	2	1.6428	0.0523	0.037
Group 4	2	1.5748	0.0598	0.0423
Group 5	2	1.2628	0.013	0.0092

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.8655	0.2164	60.7386	0.0002
Within Groups	5	0.0178	0.0036		
Total:	9	0.8833			

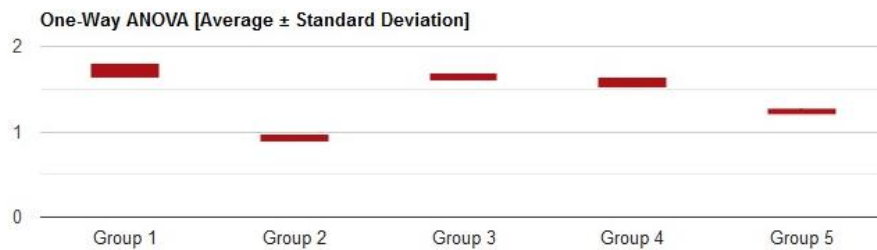


Figura 62: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. sporogenes* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* 95.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 4.5756

P-value = 0.0632

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.493	0.1547	0.1094
Group 2	2	1.757	0.1664	0.1176
Group 3	2	1.1358	0.2178	0.154
Group 4	2	1.1038	0.2082	0.1472
Group 5	2	1.5785	0.1869	0.1322

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.6491	0.1623	4.5756	0.0632
Within Groups	5	0.1773	0.0355		
Total:	9	0.8265			



Figura 63: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. tyrobutyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* BAL C.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 3.91539

P-value = 0.0834

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.8732	0.0646	0.0457
Group 2	2	1.7631	0.0254	0.018
Group 3	2	1.6985	0.052	0.0368
Group 4	2	1.8038	0.0279	0.0197
Group 5	2	1.8614	0.0706	0.0499

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.0416	0.0104	3.9154	0.0834
Within Groups	5	0.0133	0.0027		
Total:	9	0.0549			

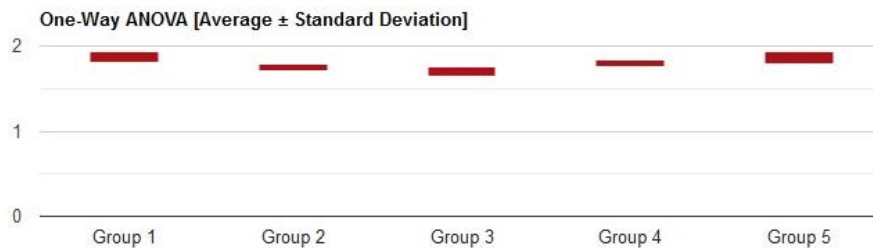


Figura 64: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. butyricum* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* BAL C.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 26.97126

P-value = 0.0014

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	0.9696	0.0918	0.0649
Group 2	2	1.5394	0.0683	0.0483
Group 3	2	1.7068	0.0448	0.0317
Group 4	2	1.4211	0.0906	0.0641
Group 5	2	1.6321	0.0899	0.0635

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.6773	0.1693	26.9713	0.0014
Within Groups	5	0.0314	0.0063		
Total:	9	0.7087			

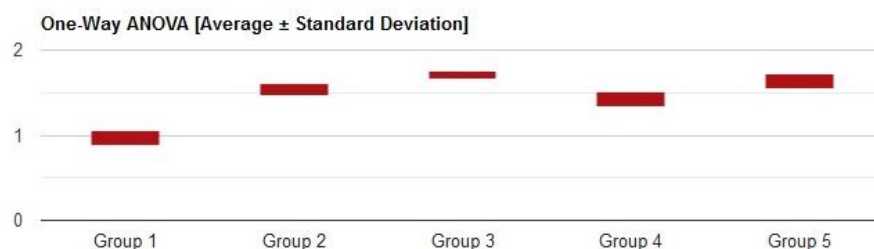


Figura 65: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. beijerinckii* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* BAL C.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 4.16968

P-value = 0.07468

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	2	1.4261	0.0439	0.031
Group 2	2	1.093	0.1067	0.0754
Group 3	2	1.2311	0.0642	0.0454
Group 4	2	1.1512	0.0368	0.026
Group 5	2	1.1008	0.1632	0.1154

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	4	0.1515	0.0379	4.1697	0.0747
Within Groups	5	0.0454	0.0091		
Total:	9	0.1969			

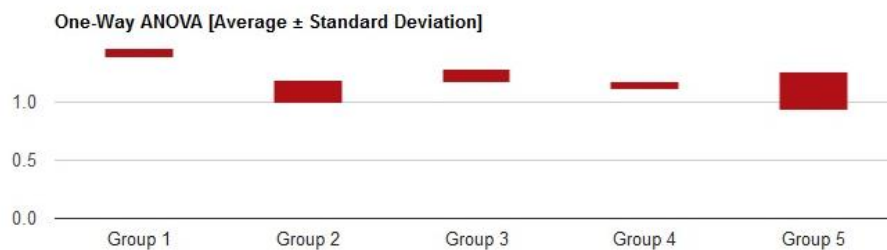
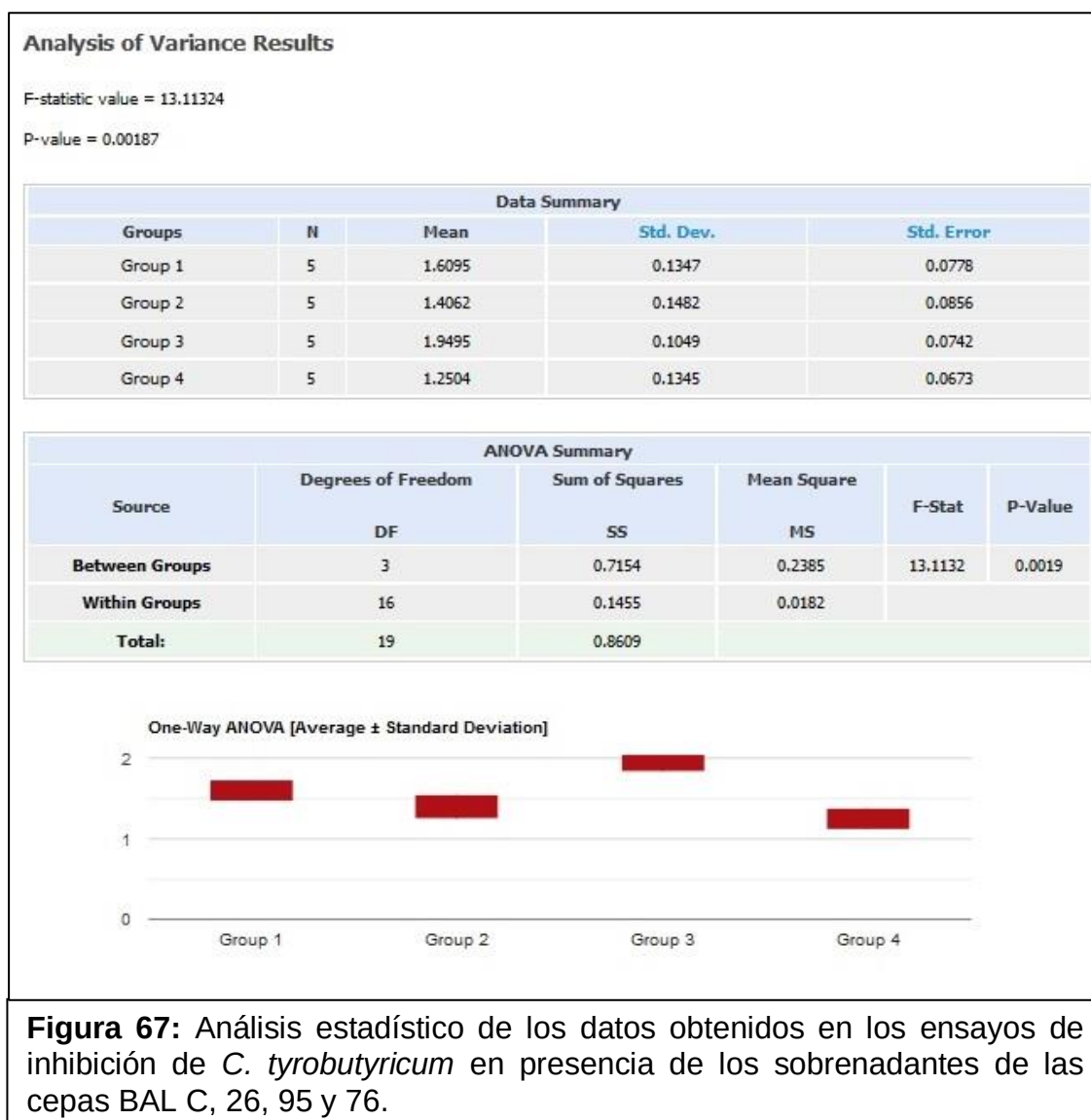


Figura 66: Análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. sporogenes* en presencia del sobrenadante de la cepa *L. casei* BAL C.

Anexo 2.2

Análisis One-Way ANOVA de los datos presentados en la Figura 33 y 34 realizado para determinar si las cepas 26, 76, 95 y BAL C difirieron en forma significativa ($p < 0.05$) en su capacidad inhibitoria contra cada especie de *Clostridium*. En caso de encontrar diferencias significativas el estudio estadístico también permitió determinar las cepas de BAL con mayor y menor capacidad inhibitoria contra cada especie de *Clostridium*. En todos los análisis los grupos 1, 2, 3 y 4 identifican a las cepas BAL C, 26, 95 y 76, respectivamente.



Analysis of Variance Results

F-statistic value = 9.30954

P-value = 0.00085

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	5	1.8	0.0721	0.0323
Group 2	5	1.7273	0.0866	0.0387
Group 3	5	1.5439	0.1504	0.0672
Group 4	5	1.5071	0.0876	0.0392

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	3	0.3002	0.1001	9.3095	0.0009
Within Groups	16	0.172	0.0107		
Total:	19	0.4721			



Figura 68: Análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. butyricum* en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 11.7143

P-value = 0.00071

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	5	1.5749	0.1232	0.0616
Group 2	5	1.4358	0.2255	0.1128
Group 3	5	1.0636	0.1345	0.0672
Group 4	5	1.0472	0.1119	0.056

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	3	0.8491	0.283	11.7143	0.0007
Within Groups	16	0.2899	0.0242		
Total:	19	1.139			



Figura 69: Análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. beijerinckii* en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.

Analysis of Variance Results

F-statistic value = 9.77272

P-value = 0.00152

Data Summary				
Groups	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Group 1	5	1.2273	0.143	0.0715
Group 2	5	1.5531	0.2417	0.1396
Group 3	5	1.5489	0.1992	0.0996
Group 4	5	1.0395	0.0862	0.0386

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	3	0.7988	0.2663	9.7727	0.0015
Within Groups	16	0.3269	0.0272		
Total:	19	1.1257			



Figura 70: Análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de *C. sporogenes* en presencia de los sobrenadantes de las cepas BAL C, 26, 95 y 76.

Anexo 3

Cromatogramas obtenidos por HPLC de fase reversa para las fracciones con actividad anticlostridial correspondientes a las cepas BAL C, 95 y 26. Se incluye el cromatograma de la línea de base (caldo MRS estéril).

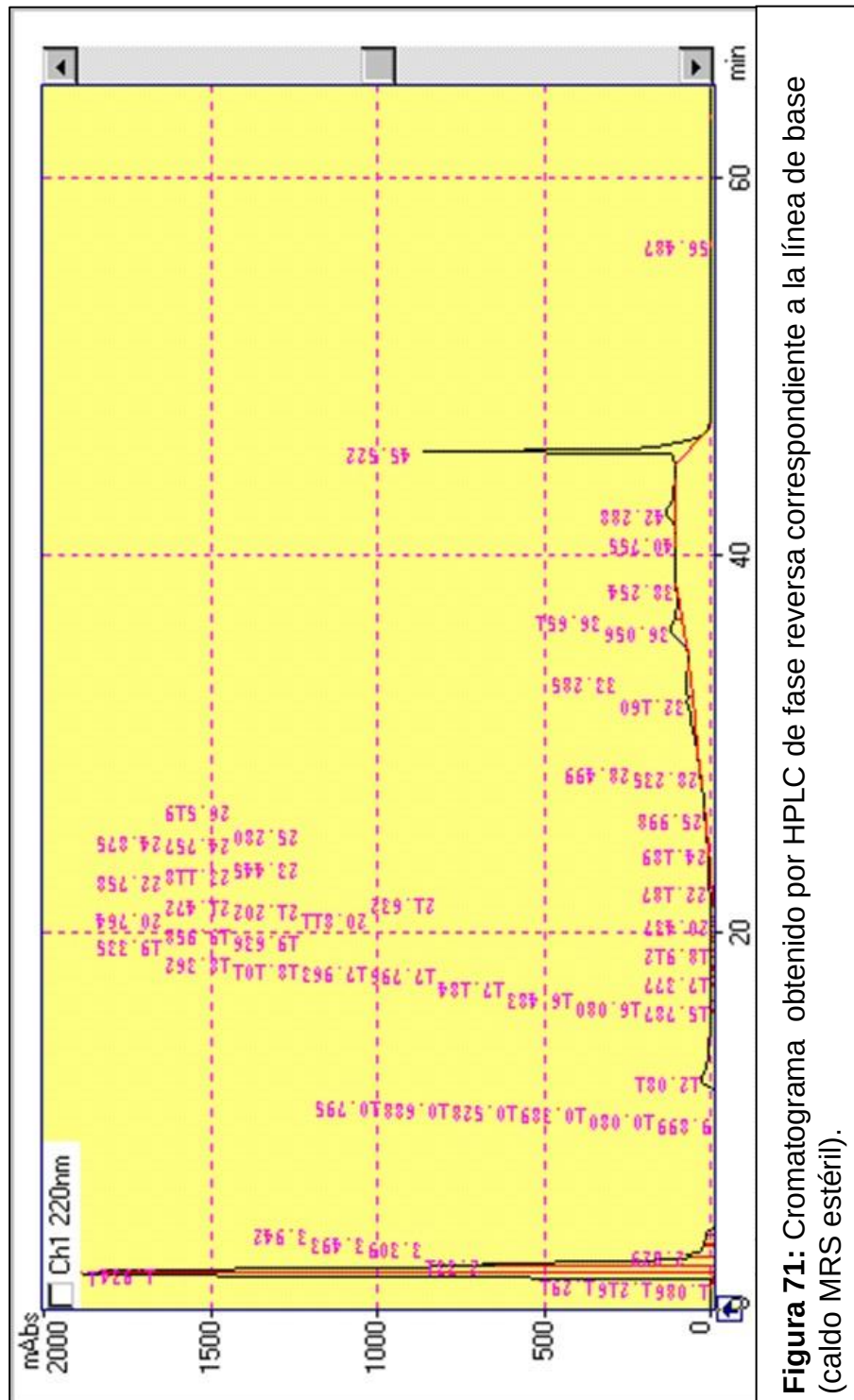


Figura 71: Cromatograma obtenido por HPLC de fase reversa correspondiente a la línea de base (caldo MRS estéril).

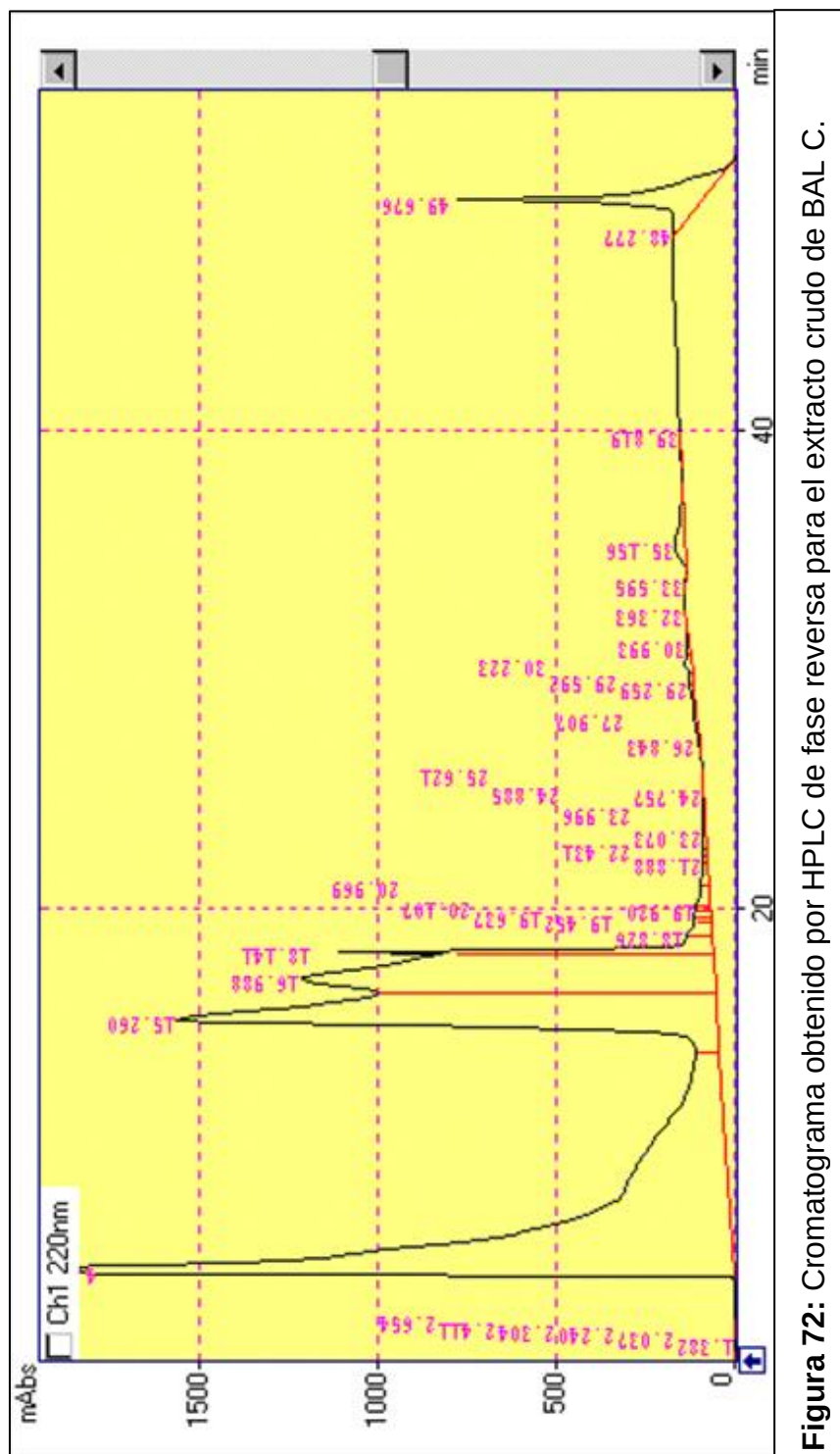


Figura 72: Cromatograma obtenido por HPLC de fase reversa para el extracto crudo de BAL C.

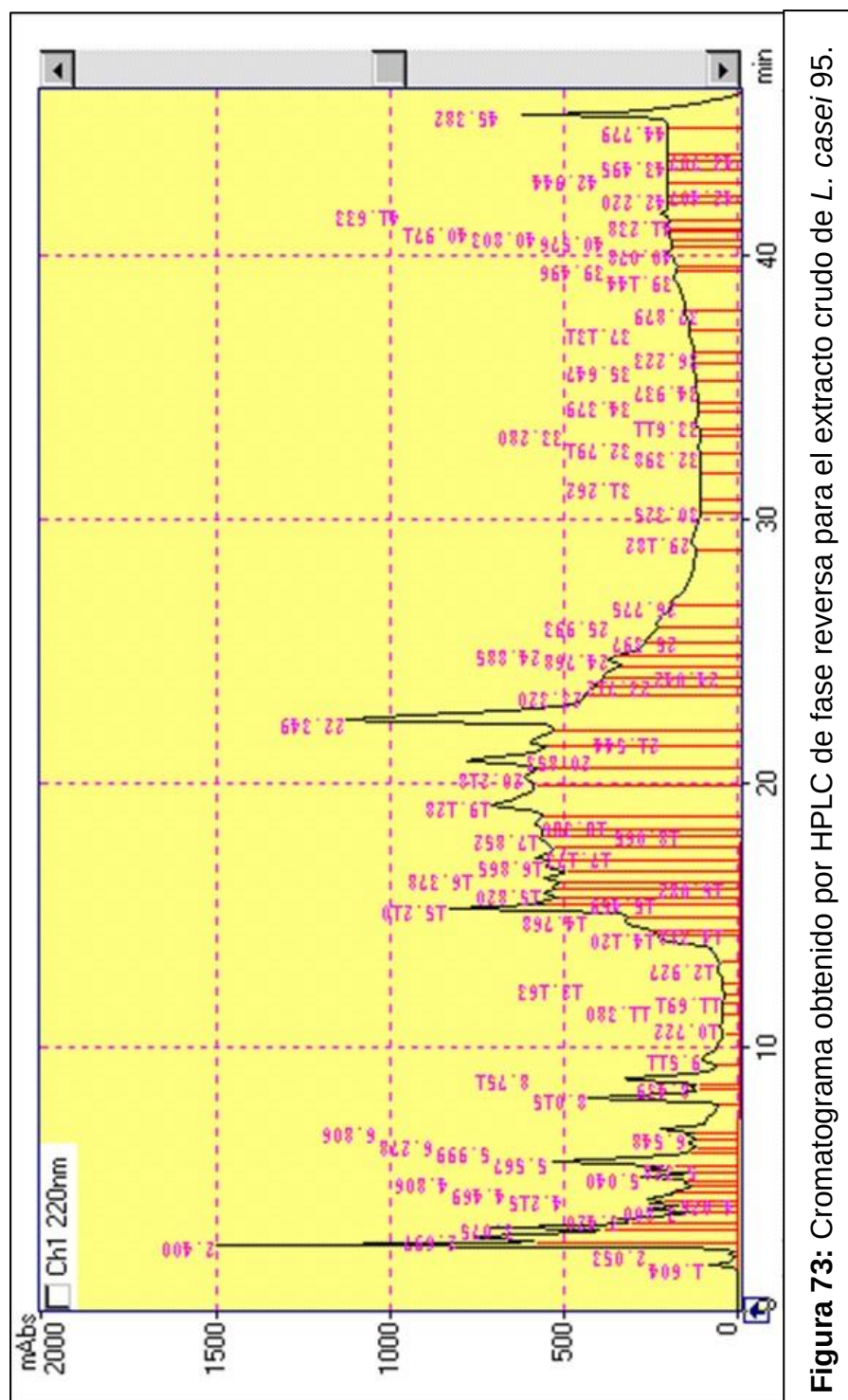


Figura 73: Cromatograma obtenido por HPLC de fase reversa para el extracto crudo de *L. casei* 95.

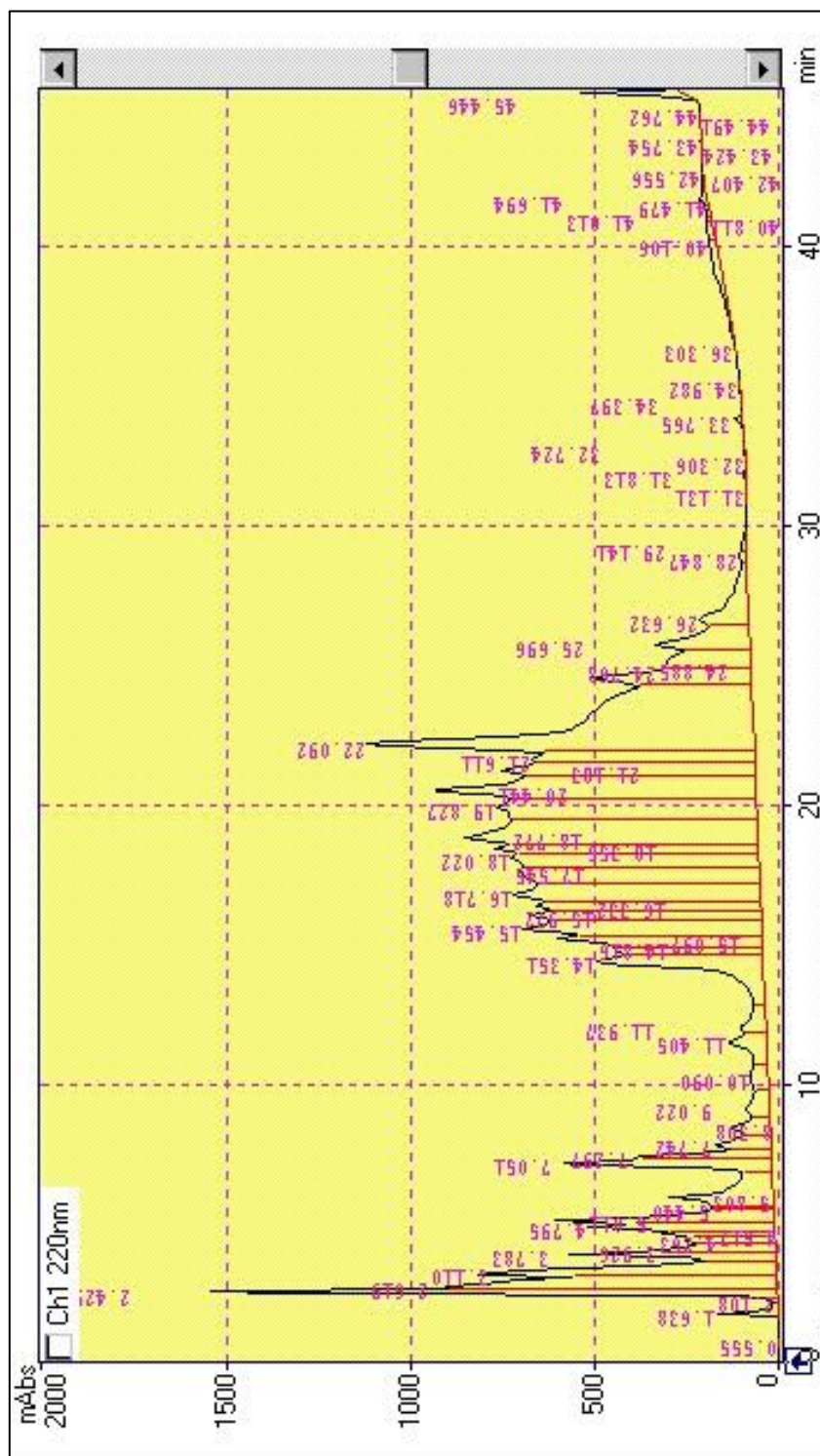


Figura 74: Cromatograma obtenido por HPLC de fase reversa para el extracto crudo de *L. casei* 26.

Anexo 4

Valores de masa (m/z) obtenidos por el análisis MS/MS a partir del ión m/z 1162.5178 correspondiente a la fracción P₄ de *L. casei* 95: 127.1518, 129.1625, 143.1418, 155.1632, 171.1564, 175.1859, 181.1732, 189.1501, 226.1952, 227.2007, 228.2176, 238.1762, 240.1973, 267.2702, 268.2325, 286.2244, 329.2492, 357.3581, 365.1971, 373.2631, 381.2744, 398.2710, 412.3577, 414.3460, 422.3372, 423.2955, 438.3168, 440.2982, 456.3148, 480.3126, 511.3464, 514.3627, 553.3701, 555.4092, 567.4208, 568.4153, 583.4196, 593.3804, 610.3849, 616.3357, 651.5192, 653.4209, 681.4886, 689.4310, 690.4242, 707.4675, 708.4533, 715.4452, 721.5601, 722.4940, 723.4412, 728.4525, 787.5433, 802.5039, 807.4706, 810.5126, 821.4996, 843.4711, 860.5095, 862.5107, 866.5643, 875.5130, 877.4953, 879.5277, 936.5613, 948.6025, 1002.6359, 1003.6225, 1004.6081, 1005.5986, 1007.5561, 1008.5524, 1033.5920, 1034.5719, 1036.6248, 1038.6588, 1039.6174, 1043.6082, 1047.5958 y 1062.6010.

Valores de masa (m/z) obtenidos por el análisis MS/MS a partir del ión m/z 1291.5745 correspondiente a la fracción P₄ de *L. casei* 95: 155.1432, 171.1683, 175.1803, 183.1909, 187.1558, 195.1771, 197.2340, 227.2100, 238.2263, 240.2222, 254.2389, 258.2073, 268.2040, 272.2434, 294.2260, 329.2866, 343.2753, 357.2501, 398.2872, 413.3396, 414.3192, 415.2863, 423.3947, 425.2749, 438.2536, 440.3511, 454.3189, 457.3636, 495.3391, 497.3908, 511.4058, 526.4260, 537.3746, 552.4323, 553.3633, 569.5128, 585.4147, 593.3580, 597.3994, 610.3647, 657.4851, 665.4445, 682.4189, 701.4564, 703.4775, 705.4771, 730.4631, 736.4200, 739.5001, 741.5306, 764.4702, 766.6019, 806.5042, 820.5456, 834.5167, 835.4949, 839.5392, 850.5163, 852.5057, 853.5362, 860.5375, 877.5200, 878.5405, 923.5823, 963.5651, 964.5870, 968.5924, 986.5893, 992.6221, 1008.6594, 1020.6225, 1024.6058, 1065.6217, 1126.6951, 1128.6981, 1129.7018, 1130.7159, 1131.7100, 1132.6963, 1134.6820, 1137.6647, 1162.6600, 1164.6997, 1165.7142, 1167.7041, 1169.6790, 1173.6857 y 1174.6500.

Valores de masa (m/z) obtenidos por el análisis MS/MS a partir del ión m/z 1425.6570 correspondiente a la fracción P₄ de *L. casei* 95: 127.1574, 129.1859, 155.1591, 167.1729, 171.1750, 175.2021, 199.2188, 211.2067, 226.2194, 228.2339, 255.2194, 266.2248, 268.2495, 284.2433, 286.2800, 300.3127, 325.2733, 327.2870, 329.2560, 342.2816, 365.3065, 383.3979, 414.3138, 416.3316, 422.3564, 426.4159, 431.3808, 438.3295, 454.3753, 457.4243, 511.4573, 515.3532, 535.4019, 553.4700, 567.4364, 570.4066, 583.4461, 586.4476, 592.4307, 602.3947, 624.4985, 632.5363, 643.4614, 682.4753, 689.4828, 701.4393, 705.5098, 715.5185, 721.4364, 729.5318, 737.5351, 738.5316, 778.6293, 802.5650, 810.5544, 816.5401, 821.5822, 834.5663, 837.5135, 859.5700, 871.5626, 876.5358, 888.5784, 891.6038, 956.6146, 958.5941, 964.5698, 992.6302, 993.5955, 1004.6425, 1005.6533, 1010.6165, 1063.7104, 1069.6614, 1076.7219, 1095.6704, 1098.6954, 1101.6809, 1104.7582, 1105.7006, 1122.7184, 1126.6716, 1152.6763, 1158.7231, 1174.8719, 1196.7925, 1215.7192, 1217.6899, 1261.8983, 1262.8464, 1263.7891, 1264.8491, 1265.8085, 1267.7772, 1268.7609, 1271.7531, 1322.7684, 1323.7562, 1326.7845, 1328.7941, 1329.6538, 1331.6759, 1334.6942 y 1340.6770.

7. Bibliografía

Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, S. and Ariff, A.B.. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. RSC Advances, Vol. 7, No. 47, 29395 - 29420.

Abdel, A.S.M., Abd, E-G.M.A. and Motawee, M.M.. (2008). Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxins production in some dairy products. The 3rd annual conference of quality education development in Egypt and the Arab region to achievement the requeriments of job markets in the globalization age (strategic vision). Faculty of Specific Education Mansoura University, pp. 1108 - 1120.

Abel-Santos, E.. (2015). Endospores, sporulation and germination. In: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. and Schwartzman, J. (Eds.). Molecular medical microbiology. 2nd Ed., Chapter 9, 163-180. Academic Press.

Abdullah, S.U., Badaruddin, M., Ali, R. and Riaz, M.N.. (2010). Effect of elementary and advanced glycation products of nisin on its preservative efficacy and digestibility. Food Chemistry, Vol. 122, No. 4, 1043 - 1046.

Adam, K.H., Flint, S.H. and Brightwell, G.. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 45, No. 8, 1539 - 1544.

Adesokan, I.A., Ekanola, Y.A. and Okanlawon, B.M.. (2010). Influence of cultural conditions on hydrogen peroxide production by lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. African Journal of Microbiology Research, Vol. 4, No. 19, 1991 - 1996.

Adiguzel, G.C. and Atasever, M.. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 14, No. 1, 4130 - 4138.

AGERA Laboratories. (2014). Antibacterial peptide cream. http://www.ageralabs.com/education/Specialty_Treatment.pdf.

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J.H.J. and ten Brink, B.. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. Journal of Applied Microbiology, Vol. 84, No. 4, 568 - 576.

Al-Hinai, M.A., Jones, S.W. and Papoutsakis, E.T.. (2015). The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 79, No. 1, 19 - 37.

Alegría, G.A.. (2013). Caracterización microbiológica de productos lácteos tradicionales para el diseño de cultivos iniciadores. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo, España.

Alfaro, L.R.A. y Chang, de L.E.A.. (2017). Evaluación de nisina y grasa en el crecimiento microbiano y propiedades físico-químicas de una bebida láctea con sabor a mango (*Mangifera indica*). Tesis de Grado. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.

Almena-Aliste, M. and Mietton, B.. (2014). Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. In Donnelly, C.W. (Ed.), The microbiology of traditional hard and semihard cooked mountain cheeses. Microbiology Spectrum, 2(1): CM-0003-2012.

Alvenäs, A.. (2015). Cheeses with blowing defects. Problematics and preventable methods. Independent Project in Food Science. Bachelor thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, No. 412. Uppsala, Sweden.

Amenu, D.. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk. Current Research in Microbiology and Biotechnology, Vol. 1, No. 6, 278 - 284.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I.. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control, Vol. 17, No. 6, 454 - 461.

Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M.D., Papadelli, M., De Vuyst, L. and Tsakalidou, E.. (2009). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening. International Dairy Journal, Vol. 19, No. 5, 330 - 335.

Angón, E., García, A., Perea, J., Acero, R., Toro-Mújica, P., Pacheco, H. y González, A.. (2013). Eficiencia técnica y viabilidad de los sistemas de pastoreo de vacunos de leche en la Pampa, Argentina. Agrociencia, Vol. 47, 443 - 456.

Arias, C.. (2013). Recuento y caracterización de *Clostridium* spp. en la ración unifeed y en la leche en relación con las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo de las ganaderías de oveja manchega. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real, España.

Arias, C., Oliete, B., Seseña, S., Jimenez, L., Pérez-Guzmán, M.D. and Arias, R.. (2013). Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination on Manchega ewe milk: determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. Small Ruminant Research, Vol. 111, No. 1 - 3, 120 - 128.

Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E. and Medina, M.. (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology, Vol. 95, No. 2, 225 - 229.

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M. and Medina, M.. (2008a). Inactivation of Gram-

negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, Vol. 227, No. 1, 77 - 82.

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M. and Medina, M.. (2008b). Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science*, Vol. 91, No. 1, 70 - 75.

Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C. and Papademas, P.. (2016). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, Vol. 73, 81 - 90.

Aureli, P., Franciosa, G. and Scalfaro, C.. (2011). *Clostridium* spp.. In Fuquay, J.W., Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences*, 2nd Edition, Vol. 4, 47 - 53. Elsevier, Amsterdam.

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M. and Garde, S.. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrate against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 172, 70 - 75.

Azevedo, A.C., Bento, C.B.P., Ruiz, J.C., Queiroz, M.V. and Mantovani, H.C.. (2015). Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 81, No. 20, 7290 - 7304.

Bachmann, H.-P.. (1999). Technologische einflussfaktoren auf die buttersäuregärung. *Agrarforschung*, Vol. 6, 137 - 140.

Bachmann, H.-P., Bütikofer, U., Fröhlich-Wyder, M.-T., Isolini, D. and Jakob, E.. (2011). Swiss-type cheeses. *Agroscope Liebefeld-Posieux Research Station ALP*, Berne, Switzerland, Elsevier Ltd..

Bardaweel, S.K.. (2014). D-Amino acids: prospects for new therapeutic agents. *Journal of Medical and Bioengineering*, Vol. 3, No. 3, 195 - 198.

Barlow, J., Broadbent, J., D'Amico, D., Drake, M., Johnson, M., Kehler, M., Kindstedt, P., Lortal, S., Marcellino, N., McMahon, D., Paxson, H., Romero, D. and Wolfe, B.. (2014). Microbes make the cheese. Doctoral thesis. American Academy of Microbiology.

Bassi, D., Cappa, F. and Cocconcelli, P.S.. (2009). A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology*, Vol. 160, No. 5, 322 - 329.

Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S. and Cocconcelli, P.S.. (2013). TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal*, Vol. 33, No. 1, 75 - 82.

Bassi, D., Puglisi, E. and Cocconcelli, P.S.. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*, Vol. 52, 106 - 118.

Bastos, de F.M.do C., Coelho, V.M.L. and Santos, da S.O.C.. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, Vol. 161, No. 4, 683 - 700.

Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgalarrrondo, M., Prévost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertlé, T. and Chobert, J.-M.. (2007). Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 103, No. 3, 584 - 593.

Beechey-Gradwell, Z.. (2016). Novel genetic engineering technology which increases leaf lipid content modifies the ensiling properties of perennial ryegrass. Master thesis. Massey University. Palmerston North, New Zealand.

Benaissa, M., Zadi-Karam, H. and Karam, N.-E.. (2017). Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 16, No. 30, 1630 - 1637.

Beresford, T.P. (2007). What are non-starter lactic acid bacteria and how do they affect cheese quality?. In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese problems solved*, 124 - 130. 1st Edition. Woodhead Publishing Limited, CRC Press.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M.. (2001). Recent advances in cheeses microbiology. *International Dairy Journal*, Vol. 11, No. 4 - 7, 259 - 274.

Bergère, J.L., Gouet, P., Hermier, J. and Mocquot, G.. (1968). Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Annales De l'Institut Pasteur De Lille*, Vol. 19, 41 - 54.

Bergère, J.L. and Sivelä, S.. (1990). Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality - Classical and new methods. *International Dairy Federation Bulletin*, Vol. 251, 15 - 23.

Beristain-Bauza, S.C., Palou, E. y López-Malo, A.. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 6, No. 2, 64 - 78.

Bermúdez, J., González, M.J., Olivera, J.A., Burgueño, J.A., Juliano, P., Fox, E.M. and Reginensi, S.M.. (2016). Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99, No. 5, 3358 - 3366.

Blagojev, N., Škrinjar, M., Vesković-Moračanin, S. and Šošo, V.. (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 17, No. 3, 7219 - 7226.

Blaschek, H.P.. (2014). *Clostridium*. In Batt, C.A. and Torterollo, M.L. (Eds.). *Encyclopedia of food microbiology*, Vol. 1, 444 - 448. Academic Press Elsevier.

Bogovič-Matijašić, B., Rajšp, M.K., Perko, B. and Rogelj, I.. (2007). Inhibition of

Clostridium tyrobutyricum in cheese by *Lactobacillus gasseri*. International Dairy Journal, Vol. 17, No. 2, 157 - 166.

Bogovič-Matijašić, B. and Rogelj, I.. (2000). *Lactobacillus* K7 – A new candidate for a probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, Vol. 38, No. 2, 113 - 119.

Borzenkov, V., Surovtsev, V. and Dyatlov, I.. (2014). Obtaining bacteriocins by chromatographic methods. Advances in Bioscience and Biotechnology, Vol. 5, No. 05, 446 - 451.

Bouksaim, M., Lacroix, C., Audet, P. and Simard, R.E.. (2000). Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. International Journal of Food Microbiology, Vol. 59, No. 3, 141 - 156.

Bove, C.G., De Angelis, M., Gatti, M., Calasso, M., Neviani, E. and Gobbetti, M.. (2012). Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa and Sharpe medium. Proteomics, Vol. 12, No. 21, 3206 - 3218.

Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G. and Litopoulou-Tzanetaki.. (2015). A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. International Journal of Food Microbiology, Vol. 200, 87 - 96.

Brändle, J., Domig, K.J. and Kneifel, W.. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control, 67, 96 - 113.

Brantes, A.P.A.. (2011). Diseño de un medio de cultivo alternative para la cepa láctica BAL-C productora de una sustancia tipo bacteriocina (STB) inhibitoria de *Listeria monocytogenes*. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Brashears, M.M., Amezquita, A. and Jaroni, D.. (2005). Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. In: Taylor, S.L. (Ed.), Advances in food and nutrition research. Vol. 50, 1 - 31. Elsevier Inc..

Braunig, J. and Hall, P.. (2005). Cheese. Milk and dairy products. In: Roberts, T.A., Cordier, J.-L., Gram, L., Tompkin, R.B., Pitt, J.I., Gorris, L.G.M. and Swanson, K.M.J. (Eds.), Microorganisms in food 6: microbial ecology of food commodities. 2nd Edition. Chapter 16, 643 - 715.

Brown, D.F.J., Wootton, M. and Howe, R.A.. (2016). Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 71, No. 3, 3 - 5.

Brunt, J., Plowman, J., Gaskin, D.J.H., Itchner, M., Carter, A.T. and Peck, M.W.. (2014). Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. PLoS Pathogens, 10(9): e1004382.

Bukharin, O.V. and Sgibnev, A.V.. (2013). Effect of metabolites of H₂O₂-producing lactobacilli on functional activity of lysozyme. Zhurnal Microbiologii, Epidemiologii, i immunobiologii, Vol. 4, 60 - 64.

Burke, D.G., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C.. (2013). Microbial production of bacteriocins for use in foods. In: McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I. and Harvey, L. (Eds.), Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals. 1st Edition. Chapter 14, 353 - 384. Woodhead Publishing Ltd..

Button, J.E. and Dutton, R.J.. (2012). Cheese microbes. Current Biology, Vol. 22, No. 15, R587 - R589.

Cabrefiga, J. and Montesinos, E.. (2017). Lysozyme enhances the bactericidal effect of BP100 peptide against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight of rosaceous plants. BMC Microbiology, Vol.17, No. 1, 39.

Campos, C.A., Rodriguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velázquez, J.. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta Maxima*). Food Research International, Vol. 39, No. 3, 356 - 364.

Campos, C.A., Castro, M.P., Rivas, F.P. and Schelegueda, L.I.. (2013). Bacteriocins in food: evaluation of the factors affecting their effectiveness. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Vol. 2, 994 - 1004. Formatex Research Center.

Cárdenas, C.N.. (2015). Estudio de las propiedades tecnológicas de las bacterias aisladas de leche materna. Aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M.E., Rossetti, L., Meucci, A. and Giraffa, G.. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. Letters in Applied Microbiology, Vol. 59, No. 3, 299 - 305.

Carrosio, S.. (2014). Caracterización de microorganismos esporulados presentes en leche pasteurizada comercial y leche cruda provenientes de tambos. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Casey, M.G., Häni, J.P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W. and Wechsler, D.. (2006). Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. Le Lait, INRA Editions, Vol. 86, No. 6, 407 - 414.

Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D. and Chikindas, M.L.. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. International Journal of Antimicrobial Agents, Vol. 46, No. 5, 494 - 501.

Chandan, R.C.. (2014). Cheese in the marketplace. In: Batt, C. (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition. Vol. 1, 384 - 394. Elsevier Ltd..

Chen, H. and Hoover, D.G.. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 2, No. 3, 82 - 100.

Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L. and Yuan, Z.. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Antimicrobials, Resistance, and Chemotherapy*, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 5, No. 217.

Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A. and Dicks, L.M.T.. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 49, 23 - 28.

Chilibroste, P.. (2015). Carga o productividad? Pasto o concentrado?: Mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay. Conference: XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. At Centro Médico Veterinario de Paysandú, Vol. 1, 158 - 162.

Christenson, J.C., Korgenski, E.K. and Relich, R.F.. (2018). Laboratory diagnosis of infection due to bacteria, fungi, parasites and rickettsiae. In: Long, S.S., Prober, C.G. and Fischer, M. (Eds.), *Principles and practice of pediatric infection diseases*. 5th Edition. Part IV Laboratory diagnosis and therapy for infectious diseases, Section A The clinician and the laboratory, Chapter 286, 1422 - 1434.e3.

Christiansen, P., Petersen, M.H., Kask, S., Møller, P.L., Petersen, M., Nielsen, E.W., Vogensen, F.K. and Ardö, Y.. (2005). Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, Vol. 15, No. 6 - 9, 901 - 909.

Ciocia, F., McSweeney, P.L.H., Piraino, P. and Parente, E.. (2013). Use of dairy and non-dairy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus* strains as adjuncts in Cheddar. *Dairy Science and Technology*, Vol. 93, No. 6, 623 - 640.

Clark, S. and Agarwal, S.. (2012). Cheddar and related hard cheeses. In: Hui, Y.H. and Evranuz, E.Ö. (Eds.), *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology*, Part III Solid cheeses, 335 - 362. Taylor and Francis Group, CRC Press.

Clark, S. and Winter, C.K.. (2015). Diacetyl in foods: a review of safety and sensory characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 14, No. 5, 634 - 643. Institute of Food Technologists.

CLSI M100 S-25. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Vol. 35, No. 3.

Colombari, G., Borreani, G. and Crovetto, G.M.. (2001). Effect of ensiling alfalfa at low and high dry matter on production of milk used to make Grana cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 84, No. 11, 2494 - 2502.

Comeron, E.A.. (2007). Eficiencia productiva de los sistemas lecheros en zonas templadas (con especial referencia a América Latina y a Argentina). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, Vol. 15, No. 1, 141 - 143.

Corrot, G.. (1989). Methodes de traite et contamination dans le département de la Haute-Loire. INRA Productions Animales, Vol. 1, 201 - 207.

Corsetti, A. and Settanni, L.. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International, Vol. 40, No. 5, 539 - 558.

Cosentino, C., Paolino, R., Freschi, P. and Calluso, A.M.. (2013). Jenny milk as an inhibitor of late blowing in cheese: a preliminary report. Journal of Dairy Science, Vol. 96, No. 6, 3547 - 3550.

Cotter, P., Hill, C. and Ross, P.R.. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. National Review of Microbiology, Vol. 3, No. 10, 777 - 788.

Cremonesi, P., Vanoni, L., Silvetti, T., Morandi, S. and Brasca, M.. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. Journal of Dairy Research, Vol. 79, No. 3, 318 - 323.

Crowell, A.M.J., Wall, M.J. and Doucette, A.A.. (2013). Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. Analytica Chimica Acta, Vol. 796, 48 - 54.

Currell, R.C.B. and van Dam-Mieras, M.C.E.. (1997). The large scale production of organic acids by micro-organisms. In: van Balken, J.A.M. (Ed.), Biotechnological innovations in chemical synthesis. Chapter 5, 115 - 146. Butterworth-Heinemann.

CXS 283-1978. (1999). General standard for cheese. Amended in 2018. Codex Alimentarius. International Food Standards. FAO and WHO.

da Silva, S.S., Vitolo, M., González, D.J.M. and de Souza, O.R.P.. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. Food Research International, Vol. 64, 527 - 536.

Daly, D.F.M., McSweeney, P.L.H. and Sheehan, J.J.. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses – A review. Dairy Science & Technology, Vol. 90, No. 1, 3 - 26.

Daly, D., McSweeney, P. and Sheehan, J.. (2012). Pink discolouration defect in commercial cheese: a review. Dairy Science and Technology, EDP sciences/Springer, Vol. 92, No. 5, 439 - 453.

D'Amato, D., Campaniello, D. and Sinigaglia, M.. (2010). Enzymes and enzymatic systems as natural antimicrobials. In: Bevilacqua, A., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (Eds.), Applications of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability. Chapter 5, 58 - 82. Bentham Science.

Dasgupta, A.P. and Hull, R.R. (1989). Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. Australian Journal of Dairy Technology, Vol. 44, 82 - 87.

Davies, J.. (1992). Introduction. In: Chadwick, D.J. and Whelan, J. (Eds.), Secondary

metabolites: their function and evolution. Ciba Foundation Symposium 171, 1 - 2. John Wiley and Sons. Chichester, England.

Davoodavadi, A., Soltan-Dallal, M.M., Lashani, E. and Tajabadi-Ebrahimi, M.. (2015). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. Jundishapur Journal of Microbiology, 8 (12): e27852.

de Fátima, P.M. and Pintado, M.. (2009). Packaging and the shelf life of cheese. In: Robertson, G.L. (Ed.), Food packaging and shelf life, chapter 6, 103 - 125. CRC Press.

De Jesús, De B.C.A.. (2016). Producción y recuperación de sustancias bioconservantes a partir de cultivos iniciadores de productos cárnicos curados. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia, España.

De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C.A. and Dicks, L.M.T.. (2006). Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, No. 7, 4761 - 4766.

de la Fuente-Salcido, N.M., García-Pérez, A.P., Díaz-León, M.A., Balagurusamy, N. y Eleazar, B.-C.J.. (2014). Bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas y su aplicación como bioconservadores y bioterapéuticos. En: Cueto, W.M.C., de la Fuente, S.N.M. y Luévanos, E.M.P. (Eds.), Fronteras de la microbiología aplicada, 32 - 51. Cuerpo Académico Ciencias Biológicas Aplicadas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, México.

de la Macorra, G.C., Brizard, A., Rincón, A.P. y Nieves, S.R.. (2004). Estudio cinético de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones de extrema alcalinidad. Revista de Tecnología y Desarrollo. Universidad Alfonso X El Sabio. Villa Nueva de la Cañada, España.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, Vol. 23, No. 1, 130 - 135.

de Oliveira, G.B., Favarin, L., Luchese, R.H. and McIntosh, D.. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: how much do we really know?. Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 46, No. 2, 313 - 321.

De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M. and Gobbetti, M.. (2016). Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewe's milk cheeses. PLoS ONE, 11(4): e0153213.

de Vladar, H.P.. (2012). Amino acid fermentation at the origin of the genetic code. Biology Direct, Vol. 7, No. 1, 6.

De Vuyst, L. and Leroy, F.. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, Vol. 13, No. 4, 194 - 199.

De Vuyst, L. and Tzakalidou, E.. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. International Dairy Journal, Vol. 18, No. 5, 476 - 485.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (Eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. Chapter 3, 91 - 142.

Del Aguila, E.M., Gomes, L.P., Freitas, C.S., Pereira, P.R. and Paschoalin, V.F.. (2016). Natural antimicrobials in food processing: bacteriocins, peptides and chitooligosaccharides. Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery, Vol. 5, 3 - 64.

Demain, A.L.. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. International Microbiology, Vol. 1, No. 4, 259 - 264.

Devi, S.M. and Halami, P.M.. (2012). Detection of mobile genetic elements in pediocin PA-1 like producing lactic acid bacteria. Journal of Basic Microbiology, Vol. 52, 1 - 7.

Dherbécourt, J., Maillard, M.B., Catheline, D. and Thierry, A.. (2008). Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. Journal of Applied Microbiology, Vol. 105, No. 4, 977 - 985.

Dias, G.. (2011). Microfiltração como alternativa na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas. Tese (doutorado), Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil.

Dias, R., Vilas-Boas, E., Campos, F.M., Hogg, T. and Couto, J.A.. (2015). Activity of lysozyme on *Lactobacillus hilgardii* strains isolates from Port wine. Food Microbiology, Vol. 49, 6 - 11.

D’Incecco, P., Faoro, F., Silvetti, T., Schrader, K. and Pellegrino, L.. (2015). Mechanisms of *Clostridium tyrobutyricum* removal through natural creaming of milk: a microscopy study. Journal of Dairy Science, Vol. 98, No. 8, 5164 - 5172.

D’Incecco, P., Gatti, M., Hogenboom, J.A., Bottari, B., Rosi, V., Neviani, E. and Pellegrino, L.. (2016). Lysozyme affects the microbial catabolism of free arginine in raw-milk hard cheeses. Food Microbiology, Vol. 57, 16 - 22.

D’Incecco, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J.A., Cocconcelli, P.S. and Bassi, D.. (2018). The late blowing defect of hard cheese: behavior of cells and spores of *Clostridium tyrobutyricum* throughout the cheese manufacturing and ripening. LWT – Food Science and Technology, Vol. 87, 134 - 141.

Djadouni, F. and Kihal, M.. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol. 55, No. 3, 435 - 443.

Doyle, C.J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D.. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk

and dairy products. International Journal of Food Microbiology, Vol. 197, 77 - 87.

Doyle, M., Steenson, L. and Meng, J.. (2013). Bacteria in food and beverage production. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F. (Eds.), Applied bacteriology and biotechnology, The prokaryotes, 241 - 256.

Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P.. (2015). Lantibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 79, No. 2, 171 - 191.

Driehuis, F.. (2013). Silage and the safety and the quality of dairy foods: a review. Agricultural and Food Science, Vol. 22, No. 1, 16 - 34.

Driehuis, F., Hoolwerf, J. and Rademaker, J.L.W.. (2016). Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. International Dairy Journal, Vol. 63, 70 - 77.

Drouin, P. and Lafrenière, C.. (2012). Clostridial spores in animal feeds and milk. In: Chaiyabutr, N. (Ed.), Milk production - An up-to-date overview of animal nutrition, management and health. Chapter 18, 375 - 394. InTech.

du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. and Krieger-Weber, S.. (2010). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. Food and Bioprocess Technology, Vol. 4, No. 6, 876 - 906.

Dündar, H.. (2006). Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Doctoral thesis. Middle East Technical University. Ankara, Turkey.

Dündar, H., Çelikbiçak, Ö., Salih, B. and Bozoğlu, T. F.. (2014). Large-scale purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* using diatomite calcium silicate. Turkish Journal of Biology, Vol. 38, No. 5, 611 - 618.

Dunge, A.. (2016). Microbiota found in raw milk – their origin and importance for cheese production. Bachelor project. Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, No. 440. Uppsala, Sweden.

Dykes, G.A.. (1995). Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. Trends in Ecology and Evolution, Vol. 10, No. 5, 186 - 189.

Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross, R.P., Hill, C. and Cotter, P.D.. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?. Frontiers in Microbiology, Vol. 7, 461.

Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Hvarstein, L.S., Holo, H. and Nes, I.F.. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 81, No. 1 - 4, 639 - 654.

Eklund, M.. (2017). Quantitative polymerase chain reaction method compared with traditional methods for *Clostridium tyrobutyricum* in clover-grass silage. Bachelor thesis. SLU, Sveriges lantbruksuniversitet. Skara, Sweden.

El Soda, M. and Awad, S.. (2014). Role of specific groups of bacteria. In: Batt, C. (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition. Vol. 1, 416 - 420. Elsevier Ltd..

Enitan, A., Adeyemo, J. and Ogunbanwo, S.T.. (2011). Influence of growth conditions and nutritional requirements on the production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. African Journal of Microbiology Research, Vol. 5, No. 15, 2059 - 2066.

Erginkaya, Z., Ünal, E. and Kalkan, S.. (2014). Microbial metabolites as biological control agents in food safety. In: Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S. and Erten, H. (Eds.), Food processing: strategies for quality assessment, 225 - 259. Food engineering series. Springer Science+Business Media New York.

Erkmen, O. and Bozoglu, T.F.. (2016). Spoilage of milk and milk products. In: Erkmen, O. and Bozoglu, T.F. (Eds.), Food microbiology: principles and practice. Chapter 19, 307 - 336. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kindom.

Eugster, E., Jakob, E. and Wechsler, D.. (2017). Cheese, processed cheese, and whey. In: Elvers, B. (Ed.), Ullmann's food and feed, Vol. 2, Part III Bulk food component, 581 - 592. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Fan, L. and Song, J.. (2013). Antimicrobial microbes-bacteriocin producing lactic acid bacteria. In: Méndez-Vila, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol. 2, Antimicrobial natural products – Biocontrol, 899 - 909.

Farkye, N.Y.. (2014). Microbiology of cheesemaking and maturation. In: Batt, C.A. and Tortorollo, M.L. (Eds.). Encyclopedia of food microbiology, Vol. 1, 395 - 401. Academic Press Elsevier.

Feligini, M., Brambati, E., Panelli, S., Ghitti, M., Sacchi, R., Capelli, E. and Bonacina, C.. (2014). One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. Food Control, Vol. 42, 71 - 77.

Felis, G.E., Salvetti, E. and Torriani, S.. (2016). Systematics of lactic acid bacteria: current status. In: Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M., Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. 2nd Edition. Chapter 2, 25 - 31. John Wiley & Sons Ltd..

Fernandes, R.. (2009). Cheese. In: Fernandes, R. (Ed.), Microbiology handbook dairy products, chapter 5, 61 - 76.

Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. and Cruz-Guerrero, A.. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 9, No. 1, 11 - 16.

Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E.. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In: Kongo, M.J. (Ed.), Lactic acid bacteria - R & D for food, health and livestock purposes, chapter 25, 589 - 514.

Food Risk Assessment group.. (2014). Survey of sulfite reducing clostridia (SRC) in New Zealand bulk raw milk. MPI Technical Paper No. 40.

Food Standards. (2009). Microbiological risk assessment of raw milk cheese. Risk assessment microbiology section. Food Standards Australia New Zealand.

Forquin, M-P. and Weimer, B.C.. (2014). *Brevibacterium*. In: Batt, C.A. and Tortorello, M.L. (Eds.), Encyclopedia of food microbiology, 324 - 330. Elsevier Ltd..

Fox, P.F.. (2011). Cheese. Overview. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (Eds.), Encyclopedia of dairy science. 2nd Edition. 533 - 543. Academic Press.

Fox, P.F. and Cogan, T.M.. (2004). Factors that affect the quality of cheese. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (Eds.). Cheese: chemistry, physics and microbiology, 1, 583-608. Elsevier Academic Press.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L.H.. (2017). Fundamentals of cheese sciences. 2nd Edition. Springer US.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. and Lynch, C.M.. (1998). Significance of non-lactic acid bacteria in Cheddar cheese. Australian Journal of Dairy Technology, Vol. 53, No. 2, 83 - 89.

Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H. and O'Mahony, J.A.. (2015). Dairy chemistry and biochemistry. 2nd Edition.

Franciosi, E., Settanni, L., Carlin, S., Cavazza, A. and Poznanski, E.. (2008). A factory-scale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. Journal of Dairy Science, Vol. 91, No. 8, 2981 - 2991.

Francis, M.B. and Sorg, J.A.. (2016). Dipicolinic acid release by germinating *Clostridium difficile* spores occurs through a mechanosensing mechanism. mSphere, 1(6): e00306-16.

Fredua-Agyeman, M., Stapleton, P., Basit, A.W., Beezer, A.E. and Gaisford, S.. (2017). *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* by commercial probiotics: a microcalorimetric study. International Journal of Pharmaceutics, Vol. 517, No. 1 - 2, 97 - 103.

Fröhlich-Wyder, M.-T. and Bachmann, H.P.. (2008). Swiss cheese. Technical-scientific information. ALP Science, No. 518.

Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G.. (2007). Lactic acid bacteria. In: Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G. (Eds.), Wine microbiology. Chapter 2, 29 - 44. Springer Science+Business Media.

Gaggiotti, M., Calvino, L.F. y Reinheimer, J.A.. (2006). Reducción de la contaminación por clostridios gasógenos. En: Reinheimer, J.A. y Zalazar, C. (Eds.), Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos. Capítulo 3, 23 - 46. Ediciones UNL.

Gaitán, V.D.M.. (2013). Aislamiento y evaluación de bacterias acidolácticas con

capacidad antagónica a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

Gálvez, A., Omar, N.B. and Abriouel, H.. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 28, No. 2, 125 -152.

Garcha, S. and Sharma, N.. (2013). Use of combination of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 and *Bacillus coagulans* MTCC 492. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7, No. 47, 5338 - 5342.

García, I.B.. (2006). Caracterización físico-química de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo HGO con el fin de proponer normas de calidad. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, México.

García, O.F., Gil, M.M. y García, O.P.P.. (2016). El queso. En: García, O.F., Gil, M.M. y García, O.P.P. (Eds.), Operaciones básicas y servicios en restaurante y eventos especiales. 2^{da} Edición. Elaboración de platos a la vista del clientes. Realización de trinchados, racionados y desespinaados. 293 - 298. Ediciones Paraninfo SA. Asturias, España.

García-Quintáns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C. and López, P.. (2008). Activation of diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 7, 1988 - 1996.

Garde, S., Arias, R., Gaya, P. and Nuñez, P.. (2011a). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, Vol. 21, No. 4, 272 - 278.

Garde, S., Ávila, M., Arias, R., Gaya, P. and Nuñez, M.. (2011b). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 150, No. 1, 59 - 65.

Garde, S., Ávila, M., Arias, R. and Núñez, M.. (2013). Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal*, Vol. 25, No. 2, 87 - 91.

Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M. and Ávila, M.. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: reuterin and nisin. *Food Control*, Vol. 44, 22 - 25.

Garde, L.-B.S., Gómez-Torres, N. and Ávila, A.M.. (2018). Spore-forming bacteria in dairy products. In: Poltronieri, P. (Ed.), *Microbiology in dairy processing: challenges and opportunities*. 1st Edition. Pp. 11 - 36. John Wiley & Sons Ltd. and Institute of Food Technologists.

Garzón, K., Ortega, C. and Tenea, G.N.. (2017). Characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from native fruits of Ecuadorian Amazon. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 66, No. 4, 473 - 481.

Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. and Mucchetti, G.. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, Vol. 97, No. 2, 1 - 19.

Georgalaki, M.D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L. and Tsakalidou, E.. (2002). Macedocin: a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 12, 5891 - 5903.

Georgalaki, M.D., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B. and Tsakalidou, E.. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiology*, Vol. 33, No. 1, 124 - 130.

Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. and Degraeve, P.. (2015). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis.

Ghoddusi, H.B., Sherburn, R.E. and Aboaba, O.O.. (2013). Growth limiting pH, water activity, and temperature for neurotoxicogenic strains of *Clostridium butyricum*. *ISRN Microbiology*, Article ID 731430.

Gilbreth, S.E. and Somkuti, G.A.. (2005). Thermophilin 110: A bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* St110. *Current Microbiology*, Vol. 51, No. 3, 175 - 182.

Glass, K. and Doyle, M.E.. (2013). Safety of processed cheese. A review of the scientific literature. Food Research Institute. University of Wisconsin-Madison. Madison, United States.

Gleeson, D., O'Connell, A. and Jordan, K.. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, Vol. 52, No. 2, 217 - 227.

Gobbetti, M.. (2004). Extra-hard varieties. In Fox, P.F., McSweeney, P.H.L., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (Eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Volume 2: major cheese groups, 3rd Edition, 51 - 70.

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P. and Garde, S.. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*, Vol. 42, 82 - 88.

Gómez-Torres, N., Garde, S., Peirotén, Á. and Ávila, M.. (2015). Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control*, Vol. 56, 186 - 194.

González, L. and Zárate, V.. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, Vol. 82, No. 2, 236 - 241.

González, R.E.P.. (2010). Caracterización de la composición físico química del queso

fresco elaborado artesanalmente en Sehuilaca, municipio de Minatitlán, Veracruz. Tesis de Grado. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

Grande, B.M.J., Lucas, R., López, A.M.C., Pérez, P.R. y Gálvez, A.. (2011). Bioconservación de alimentos cárnicos. Anales, Vol. 24, No. 1. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

Guerra, N.P., Rua, M.L. and Pastrana, L.. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. International Journal of Food Microbiology, Vol. 70, No. 3, 267 - 281.

Guinee, T.P. and O'Callaghan, D.J.. (2010). Control and prediction of quality characteristics in the manufacture and ripening of cheese. In: Law, B.A. and Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of cheesemaking. 2nd Edition. 260 - 329. Blackwell Publishing Ltd..

Gupta, T.B. and Brightwell, G.. (2017). Farm level survey of spore-forming bacteria on four dairy farms in the Waikato region of New Zealand. Wiley Microbiology Open, 6(4): e00457.

Gut, I.M., Blanke, S.R. and van der Donk, W.A.. (2011). Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. ACS Chemical Biology, Vol. 6, No. 7, 744 - 752. ACS Publications.

Gutiérrez, M.J.. (2005). Caracterización inmunológica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Hafner, S.D., Howard, C., Muck, R.E., Franco, R.B., Montes, F., Green, P.G., Mitloehner, F., Trabue, S.L. and Rotz, C.A.. (2013). Emission of volatile organic compounds from silage: compounds, sources and implications. Atmospheric Environment, Vol. 77, 827 - 839.

Halász, A.. (2009). Lactic acid bacteria. In: Halász, A. (Ed.), Food quality and standards, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Vol. III, 70 - 82.

Hantsis-Zacharov, E. and Halpern, M.. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and lipolytic traits. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 22, 7162 - 7168.

Hassan, F.A.M., Abd El-Gawad, M.A.M. and Enab, A.K.. (2013). Flavour compounds in cheese (Review). Research on Precision Instrument and Machinery, Vol. 2, No. 2, 15 - 29.

Hati, S., Mandal, S. and Prajapati, J.B.. (2013). Novel starters for value added fermented dairy products. Current Research in Nutrition and Food Science, Vol. 1, No. 1, 83 - 91.

Hauser, C., Müller, U., Sauer, T., Augner, K. and Pischetsrieder, M.. (2014). Maillard reaction products as antimicrobial components for packaging films. Food Chemistry, Vol. 145, 608 - 613.

Hayek, S.A., Gyawali, R. and Ibrahim, S.A.. (2013). Antimicrobial natural products. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol. 2, 910 - 920.

Heredia-Castro, P.Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A.F. y Vallejo-Cordoba, B.. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, Vol. 42, No. 6, junio, 340 - 346.

Hernandez, B.C., Garcia, C.M.I., Gutierrez, U.J.A., Benavides, L.J.A. and Rodríguez, S.D.G.. (2017). Antimicrobial antibacterial and spore germination activity from an avocado extract enriched in bioactive compounds. Patent Application Publication, Pub. No.: US 2017/0055526 A1.

Herreros, E.M.A.. (2010). Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales. Tesis Doctoral. Universidad de León. León, España.

Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H.L., Pridmore, R.D., Gysler, C., Kleerebezem, M. and Teixeira, de M.M.J.. (2014). H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 80, No. 7, 2229 - 2239.

Hewitt, R.E.. (1997). Cell immobilisation of *Lactobacillus acidophilus*, a probiotic, for potential therapeutic usage. Master thesis. Dublin City University. Dublin, Ireland.

Heyndrickx, M.. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, Article ID 561975, 11 pages. Hindawi Publishing Corporation.

Higuera, C.O.F. y Trisancho, R.J.L.. (2006). Estudio electroquímico de la reducción del peróxido de hidrógeno sobre aleaciones utilizadas en la industria joyera. *Scientia et Technica*, Año XII, No. 30, 349 - 354.

Hill, A.R. and Kethireddipalli, P.. (2013). Dairy Products: cheese and yogurt. In: Eskin, N.A.M. and Shahidi, F. (Eds.), *Biochemistry of Food*, 3rd Edition. Part II: Biochemistry of food processing, Chapter 8, 319 - 362. Academic Press, Elsevier.

Hillhouse, E.A.. (2012). An investigation into the effects of a simulated human gastrointestinal tract has on *Bacillus cereus* and *Bacillus WEIHENSTEPHANENSIS* viability and pathogenicity. Doctoral thesis. University of St. Andrews. Scotland, United Kingdom.

Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., Suzuki, Y., Nobuta, Y., Sudou, Y., Nakamura, O., Kagaya, I., Goshima, H., Kodama, Y., Icatro, F.C., Koizumi, W., Saigenji, K., Miura, S., Sugiyama, T. and Kimura, N.. (2004). Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *Helicobacter*, Vol. 9, No. 5, 429 - 435.

Hobot, J.A.. (2015). Bacterial ultrastructure. In: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. and Schwartzman, J. (Eds.), Molecular medical microbiology. Vol. 1, Chapter 2, 7 - 32. Academic Press.

Hofstetter, S., Gebhardt, D., Ho, L., Gänzle, M. and McMullen, L.M.. (2013). Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. Food Microbiology, Vol. 34, No. 1, 46 - 51.

Hovinen, M., Aisla, A. and Pyo, S.. (2005). Visual detection of technical success and effectiveness of teat cleaning in two automatic milking systems. Journal of Dairy Science, Vol. 88, No. 9, 3354 - 3362.

Huc, D., Roland, N., Grenier, D., Challos, S., Michon, C. and Mariette, F.. (2014). Influence of salt content on eye growth in semi-hard cheeses studied using magnetic resonance imaging and CO₂ production measurements. International Dairy Journal, Vol. 35, No. 2, 157 - 165.

Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G. and Coton, E.. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 13, No. 4, 437 - 456.

Iacumin, L., Ginaldi, F., Manzano, M., Anastasi, V., Reale, A., Zotta, T., Rossi, F., Coppola, R. and Comi, G.. (2015). High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. Food Microbiology, Vol. 46, 357 - 367.

Ingham, S.C., Hassler, J.R., Tsai, Y.-W. and Ingham, B.H.. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. International Journal of Food Microbiology, Vol. 43, No. 3, 173 - 183.

Ivy, R.A. and Wiedmann, M.. (2014). *Clostridium tyrobutyricum*. In: Robinson, R., Batt, C.A. and Patel, P. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, pp. 468 - 473.

Jakob, E.. (2011). Les fermentations butyriques et leurs analyses. Groupes de discussion. ALP forum no. 85. Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP.

Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A.. (2005). Milk, fermentation and fermented and nonfermented dairy products. In: Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (Eds.), Modern Food Microbiology. Food science text series. 7th Edition. Chapter 7, 149 - 173. Springer Science + Business Media, Boston, United States.

Jiménez, L., Oliete, B., Arias, C., Garzón, A., Caballero, J., Romero, J., Pérez-Guzmán, M.D. y Arias, R.. (2013). Nuevas herramientas en los sistemas de control de calidad de leche de oveja: evaluación de la composición, microbiológica y propiedades tecnológicas para la producción de queso. Tierras Ovino. Pequeños Rumiantes, No. 4, 32 - 43.

Jiménez, M.J.J.. (2015). Evaluación y diseño de bacterias lácticas (BAL) de origen alimentario y de otros hospedadores como factorías celulares de producción de bacteriocinas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Jiménez, P.S.. (2010). Queso, cuajada y requesón. En Jiménez, P.S. y Sarmiento, P.P. (Eds.), Leche: de la producción al consumo, Módulo 03: Derivados lácteos, 33 - 46. IMC S.A.. Madrid, España.

Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D. and Park, J.M.. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. Bioresource Technology, Vol. 99, No. 14, 6666 - 6672.

Johnson, E.M., Jung, Y.-G., Jin, Y.-Y., Jayabalan, R., Yang, S.H. and Suh, J.W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1 - 25. Taylor & Francis Group LLC.

Johnson, M. and Law, B.A.. (2010). The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. In: Law, B.A. and Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of cheesemaking, 2nd Ed., Chapter 8, 260 - 329. Blackwell Publishing Ltd..

Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. and Tagg, J.R.. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiology, Vol. 25, No. 2, 228 - 234.

Julien, M.C., Dion, P., Lafrenière, C., Antoun, H. and Drouin, P.. (2008). Sources of clostridia in raw milk on farms. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 74, No. 20, 6348 - 6357.

Kabuki, T., Uenishi, H., Watanabe, M., Seto, Y. and Nakajima, H.. (2007). Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. Journal of Applied Microbiology, Vol. 102, No. 4, 971 - 980.

Kalač, P.. (2011). The effect of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. Food Chemistry, Vol. 125, No. 2, 307 - 317.

Kalchinov, V., Dimitrov, S. and Belcheva, M.. (2009). *In vitro* study of bactericidal effect of antimicrobial agents used in modern endodontics. Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers), book 2, 79 - 83.

Kapoor, R. and Metzgel, L.E.. (2008). Process cheese: scientific and technological aspects– a review. Comprehensive Reviews in Food and Food Safety, Vol. 7, No. 2, 194 - 214.

Karpiński, T.M. and Szkaradkiewicz, A.K.. (2016). Bacteriocins. In: Caballero, B., Finglas, P.M. and Toldrá, F. (Eds.), Encyclopedia of Food and Health, Vol. 1, 312 - 319. Academic Press, Elsevier.

Kaur, S. and Kaur, S.. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. Frontiers in Pharmacology, Vol. 6, 272.

Khalid, K.. (2011). An overview of lactic acid bacteria. International Journal of Biosciences, Vol. 1, No. 3, 1 - 13.

Khanal, P.. (2009). Changes and losses in silages during aerobic exposure. Master

thesis. Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, Hebrew University of Jerusalem. Jerusalem, Israel.

Kholia, S.. (2017). Isolation of lactic acid bacteria and detection of their antimicrobial activity. International Journal on Emerging Technologies, special issue NCETST-2017, Vol. 8, No. 1, 260 - 266.

Kindstedt, P.S.. (2013). The basics of cheesemaking. Microbiology Spectrum, 1(1): CM-0002-2012.

Kindstedt, P.S., Hillier, A.J. and Mayes, J.J.. (2010). Technology, biochemistry and functionality of Pasta Filata/Pizza Cheese. In: Law, B.A. and Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of Cheesemaking, 2nd Edition. 330 - 359. Blackwell Publishing Ltd..

Klantschitsch, T.. (2008). Influence of microfiltration on the quality of semi-hard cheese from raw milk with particular emphasis on *Clostridium tyrobutyricum* spores. Doctoral thesis. Diss. ETH No. 13233. Swiss Federal Institute of Technology (ETH). Zürich, Switzerland.

Klijn, N., Nieuwenhof, F.F.J., Hoolwerf, J., van der Waals, C.B. and Weerkamp, A.H.. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 8, 2919 - 2924.

Knichý, M.. (2005). Possibilities to improve silage conservation. Effects of crop, ensiling technology and additives. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Vol. 62.

Kołakowski, P., Podolak, R. and Kowalska, M.. (2012). Microbial profile of Gouda cheese during ripening in two independent chambers - a short report. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 62, No. 3, 179 - 184.

Kongo, J.M.. (2013). Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments. In: Kongo, J.M. (Ed.), Lactic acid bacteria – R & D for food, health and livestock purposes, chapter 1, 3 - 22.

Kristensen, J.M.B., Nielsen, E.W. and Josephsen, J.. (2005). Manufacture of cheese: operational procedures and processing equipment. In: Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, Å.S., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P.S. and Toldrá, F. (Eds.), Handbook of food and beverage fermentation technology. Chapter 17, 309 - 326. Taylor & Francis e-Library. New York, United States.

Lalpuria, M., Karwa, V., Anantheswaran, R.C. and Floros, J.D.. (2012). Modified agar diffusion bioassay for better quantification of Nisaplin®. Journal of Applied Microbiology, Vol. 114, No. 3, 663 - 671.

Le Bourhis, A.-G., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.,-R. and Tholozan, J.-L.. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. International Journal of Food Microbiology, Vol. 113, No. 2, 154 - 163.

Leboš, P.A., Kos, B., Beganović, J., Uroić, K., Bučan, D. and Šušković, J.. (2013). Antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of autochthonous starter cultures as safety parameters for fresh cheese production. *Mljekarstvo*, Vol. 63, No. 4, 185 - 194.

Ledenbach, L.H. and Marshall, R.T.. (2009). Microbiological spoilage of dairy products. In: Sperber, W.H. and Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the microbiological spoilage of food and beverage. Food microbiology and food safety*. Springer Science + Business Media, New York, United States.

Leggett, M.J., Schwarz, J.P., Burke, P.A., McDonnell, G., Denyer, S.P. and Maillard, J.-Y.. (2015). Mechanism of sporicidal activity for the synergistic combination of peracetic acid and hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 82, No. 4, 1035 - 1039.

Leroy, F. and De Vuyst, L.. (2010). Bacteriocins from lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, Vol. 65, No. 3, 143 - 149.

Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y. and Jin, Q.. (2015a). Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol. 28, No. 5, 620 - 631.

Li, Y., Zhang, P., Xu, D., Xu, C. and Gu, T.. (2015b). D-amino acids enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia in lab tests. *Corrosion*, Paper No. 5522. NACE International, Houston, Texas, United States.

Li, Y., Jia, R., Al-Mahamedh, H.H., Xu, D. and Gu, T.. (2016). Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Frontiers in Microbiology*, June 2016, Vol. 7, 896.

Librán, C.-M.C.M.. (2013). Alternatives to control microbiological cheese defects: use of aromatic plants. Doctoral thesis. Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete, Spain.

Licitra, G., Radulovic, Z., Miocinovic, J., Uzunsoy, I., Özer, B., Bintsis, T., Alichanidis, E., Herian, K. and Jelen, P.. (2017). Pasta-filata cheeses. In: Papademas, P. and Bintsis, T. (Eds.), *Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics*. Part II, Chapter 8, 368 - 391. John Wiley & Sons Ltd.. Chichester, UK.

Lin, X.B., Lohans, C.T., Duar, R., Zheng, J., Vederas, J.C., Walter, J. and Gänzle, M.. (2015). Genetic determinants of reutericyclin biosynthesis in *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 81, No. 6, 2032 - 2041.

Liu, H., Taylor, T.H., Pettus, K., Johnson, S., Rapp, J.R. and Trees, D.. (2016). Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, Vol. 5, No. 46, 1.

Liu, J., Miao, S., Huang, W., Turner, E.R., Luo, Y., Li, J., Wang, Q. and Yan, S.. (2013). Identification of *Clostridium butyricum* as the bacteria causing soy sauce explosion and leakage and its control using nisin. *Food Control*, Vol. 34, No. 2, 509 - 513.

Lodi, R.. (1990). The use of lysozyme to control butyric acid fermentation. Bulletin of the International Dairy Federation, Vol. 251, 51 - 54.

Lorenzo, L.G. y Raffo, S.M.. (2015). *Lactococcus lactis* nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua*. Tesis de Grado. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Losso, J.N., Nakai, S. and Charter, E.A.. (2000). Lysozyme. In: Naidu, A.S. (Ed.), Natural food antimicrobial systems. Chapter 6, 185 - 210. CRC Press.

Lu, M. and Wang, N.S.. (2017). Spoilage of milk and dairy products. In: Bevilacqua, A., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (Eds.), The microbiological quality of food. Part II: A focus on food spoilage, 151 - 178. Woodhead Publishing.

Lü, X., Hu, P., Dang, Y. and Liu, B.. (2014). Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. Food Control, Vol. 43, 276 - 283.

Lücke, E. and Jager, M.. (1997). Other preservatives. In: Lücke, E. and Jager, M. (Eds.), Antimicrobial food additives: characteristics - uses - effects. 2nd Edition. Pp. 222 - 252. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Luján, M.I.. (2010). Determinación de los tiempos de reducción decimal (D) a distintas temperaturas de cepas de *Alicyclobacillus* spp. aisladas durante la elaboración de jugos concentrados de manzana. Comportamiento de las mismas frente a sanitizantes de uso industrial. Tesis de Grado. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Maciel, N.E.. (2008). Lisogenia y mecanismos nativos de fagorresistencia presentes en bacterias lácticas salvajes y comerciales. Tesis Magistral. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B. and Kolstrup, C.. (2006). Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. Journal of Dairy Science, Vol. 89, No. 10, 3866 - 3875.

MAGyP. (2015). Quesos. Concentración de nutrientes. Nutrición y Educación Alimentaria, Ficha No. 38. Alimentos Argentina, MAGyP. www.alimentosargentinos.gob.ar.

Maliničová, L., Píknová, M., Pristaš, P. and Javorský, P.. (2011). Uncovering the mechanism of resistance against type III bacteriocin, enterolysin A. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Science and technology against microbial pathogens: research, development and evaluation, Chapter: Antimicrobial microbes and viruses. Biosynthesis of antibiotics, pp. 428 - 432. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd..

Manu, D.K.. (2012). Antimicrobial effectiveness of phenyllactic acid against foodborne pathogenic bacteria and *Penicillium* and *Aspergillus* molds. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. Iowa, United States.

Marcó, B.M., Moineau, S. and Quiberoni, A.. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, Vol. 2, No. 3, 149 - 158.

Markiewicz, L.H., Biedrzycka, E., Wasilewska, E. and Bielecka, M.. (2010). Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains. *Folia Microbiologica*, Vol. 55, No. 5, 481 - 488.

Martin, H. and Maris, P.. (2012a). Synergism between hydrogen peroxide and seventeen acids against six bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 113, No. 3, 578 - 590.

Martin, H. and Maris, P.. (2012b). Synergism between hydrogen peroxide and seventeen acids against five agri-food-borne fungi and one yeast strain. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 113, No. 6, 1451 - 1460.

Martin, N.H.. (2014). Sporeforming bacteria and milk quality. *Dairy Research East, Pro-Dairy*.

Martín, R. and Suárez, J.E.. (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 2, 400 - 405.

Martínez, B. y Rodríguez, A.. (2007). Nisina y otros lantibióticos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Villviciosa. Asturias, España.

Martínez, B., Rodríguez, A. and Suárez, E.. (2016). Antimicrobial peptides produced by bacteria: the bacteriocins. In: Villa, T.G. and Vinas, M. (Eds.), *New weapons to control bacterial growth*, pp. 15 - 38. Springer International Publishing Switzerland.

Martínez-Cuesta, M., Carmen, M., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T. and Peláez, C.. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFLP 3593 to the starter. *International Dairy Journal*, Vol. 20, No. 1, 18 - 24.

Martins, J.M., Galinari, É., Pimentel-Filho, N.J., Ribeiro, Jr.J.I., Furtado, M.M. and Ferreira, C.L.L.F.. (2015). Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 46, No. 1, 219 - 230.

Marwati, T., Cahyaningrum, N., Widodo, S., Januarsyah, T. and Purwoko. (2018). Inhibitory activity of bacteriocin produced from *Lactobacillus* SCG 1223 toward *L. monocytogenes*, *S. thypimurium* and *E. coli*. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 102, No. 1, p. 012091. IOP Publishing.

Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hilgsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A. and Thonart, P.. (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp.. *Biotechnology for Biofuels*, Vol. 5, No. 1, 35.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H. and Leroi, F.. (2009). Selection and

evaluation of seafood-borne psychrotropic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, Vol. 26, No. 6, 638 - 644.

Mateos, P.F.. (2000). Producción industrial de metabolitos secundarios. Disertación. Capítulo 7, 34 - 40. Universidad de Salamanca. Salamanca, España.

Mathot, A.G., Beliard, E. and Thuault, D.. (2003). *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 86, No. 10, 3068 - 3074.

Mato, R.L. and Alatossava, T.. (2010). Effects of copper on germination, growth and sporulation of *Clostridium tyrobutyricum*. *Food Microbiology*, Vol. 27, No. 3, 434 - 437.

McHugh, L. and Arthur, J.W.. (2008). Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. *PLoS Computational Biology*, 4(2): e12.

McMahon, D.J. and Oommen, B.S.. (2013). Casein micelle structure, functions, and interactions. In: McSweeney, P.H.L. and Fox, P.F. (Eds.), *Advanced dairy chemistry, volume 1A: proteins: basic aspects*, 4th Edition, 185 - 209. Springer, Boston, MA.

McSweeney, P.L.H.. (2007). The microbiology of cheese ripening. In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese problems solved*. 1st Edition. Woodhead Publishing Limited, CRC Press.

McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G. and Fox, P.F.. (2004). Diversity of cheese varieties: an overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.H.L., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (Eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Volume 2: major cheese groups*, 3rd Edition, 1 - 22.

Menon, R., Shields, M., Duong, T. and Sturino, J.M.. (2013). Development of a carbohydrate-supplemented semidefined medium for the semiselective cultivation of *Lactobacillus* spp.. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 57, No. 3, 249 - 257.

Merino, T.P.. (2012). Guía de quesos de Canarias. Instituto Canario de Calidad Agroalimentaria. Canarias, España.

Mora, P.F. y García, G.A.. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de Grado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

Morandi, S. and Brasca, M.. (2012). Safety aspects, genetic diversity and technological characterization of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control*, Vol. 23, No. 1, 203 - 209.

Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., Castiglioni, B. and Brasca, M.. (2015). Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe*, Vol. 34, 44 - 49.

Morandi, S., Silveti, T. and Brasca, M.. (2013). Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 103, No. 1, 239 - 249.

Mortensen, J.E. and Graeter, L.J.. (2015). Microbiology. In: Graeter, L.J., Hertenstein, E.G., Accurso, C.E. and Labiner, G.H. (Eds.), Elsevier's Medical laboratory science examination review, 1st Edition, chapter 1, 1 - 49. Saunders Elsevier.

Motahari, P., Mirdamadi, S. and Rad, M.K.. (2016). A sequential statistical approach towards an optimized production of bacteriocin by *Lactobacillus pentosus* TSHS. Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 40, No. 6, 1238 - 1246.

Mucchetti, G. and Zambrini, A.V.. (2017). Milk quality and processing. In: Conto, F. (Ed.), Advances in dairy products, Part I Ingredients for dairy products manufacturing. John Wiley & Sons Ltd.. Chichester, UK.

Mullan, W.M.A.. (2012). Causes of early gas production in Cheddar cheese. [Online]. Available from: <https://www.dairyscience.info/index.php/cheese-quality/67-causes-of-early-gas-production-in-cheddar-cheese.html>.

Müller, C.E.. (2012). Impact of harvest, preservation and storage conditions on forage quality. In: Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S. and Miraglia, N. (Eds.), Forages and grazing in horse nutrition. 2nd Edition. Vol. 132, 237 - 253. Wageningen Academic Publishers.

Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F. and Hutzler, M.. (2015). Nisin and its usage in breweries: a review and discussion. Journal of the Institute of Brewing, Vol. 121, No. 3, 309 - 319.

Murphy, S.C., Martin, N.H., Barbano, D.M. and Wiedmann, M.. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. Journal of Dairy Science, Vol. 99, No. 12, 10128 - 10149.

Mutaguchi, Y., Kobayashi, J., Oikawa, T. and Ohshima, T.. (2016). D-Amino acids in fermentative foods. In: Yoshimura, T., Nishikawa, T. and Homma, H. (Eds.), D-Amino acids. Physiology, metabolism, and application. Springer Japan.

Nami, Y., Haghshenas, B., Haghshenas, M. and Khosroushahi, A.Y.. (2015). Antimicrobial activity and the presence of virulence factors and bacteriocin structural genes in *Enterococcus faecium* CM33 isolated from ewe colostrum. Frontiers in Microbiology, Vol. 6, 782.

Naz, S., Cretenet, M. and Vernoux, J.P.. (2013). Current knowledge on antimicrobial metabolites produced from aromatic amino acid metabolism in fermented products. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol. 1, 337 - 346.

Nes, I.F., Gabrielsen, C., Brede, D.A. and Diep, D.B.. (2016). Novel developments in bacteriocins from lactic acid bacteria. In: Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (Eds.), Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. 2nd Edition. Chapter 5, 80 - 99. John Wiley & Sons Ltd..

Nescier, I., Ramos, E., De María, M., Bonzi, E., Bonvin, C. y Thomas, J.. (2015). Vías de

contaminación con esporas generadoras de gas butírico (*Clostridium*) a partir del silaje consumido por las vacas lecheras. FAVE, Sección Ciencias Agrarias, Vol. 14, No. 1, 90 - 103.

Neureiter, M., dos Santos, P.J.T., Lopez, P.C., Pichler, H., Kirchmayr, R. and Braun, R.. (2005). Effect of silage preparation on methane yields from whole crop maize silage. In: Ahring, B.K. and Hartmann, H. (Eds.), Proceedings of the 4th international symposium on anaerobic digestion of solid waste, Vol. 1, 109 - 115. BioCentrum-DTU, Copenhagen.

Neviani, E., Carminati, D., Veaux, M., Hermier, J. and Giraffa, G.. (1991). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains resistant to lysozyme. Le Lait, INRA Editions, Vol. 71, No. 1, 65 - 73.

Neysens, P., Messens, W., Gevers, D., Swings, J. and De Vuyst, L.. (2003). Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. Microbiology, Vol. 149, No. 4, 1073 - 1082.

Nieto, A.P.D.. (2010). Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D.O. "Manchego", para su selección como cultivo iniciador. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla - La Mancha. Ciudad Real, España.

Noble, W.S. and MacCoss, M.J.. (2012). Computational and statistical analysis of protein mass spectrometry data. PLoS Computational Biology, 8(1): e1002296.

Noll, K.S., Prichard, M.N., Khaykin, A., Sinko, P.J. and Chikindas, M.L.. (2012). The natural antimicrobial peptide subtilisin acts synergistically with glycerol monolaurate, lauric arginate, and ϵ -poly-L-lysine against bacterial vaginosis-associated pathogens but not human lactobacilli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 56, No. 4, 1756 - 1761.

Noordiana, N., Fatimah, A.B. and Mun, A.S.. (2013). Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp. International Food Research Journal, Vol. 20, No. 1, 117 - 124.

Nsofor, O.N. and Frank, J.F.. (2013). Milk and dairy products. In: Doyle, M.P. and Buchanan. R.L. (Eds.), Food microbiology: fundamentals and frontiers. 4th Edition. Chapter 7, 169 - 186. ASM Press, Washington, D.C., United States.

Nyberg, J.. (2016). Microorganisms influence on quality and flavor of cheese. Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, No. 437. Bachelor thesis. Uppsala, Sweden.

O'Connor, P.M., O'Shea, E.F., Guinane, C.M., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C.. (2015). Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 81, No. 12, 3953 - 3960.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A.. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology, Vol. 2, No. 8, 219 - 227.

Oliveira, R.B.A., Margalho, L.P., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Portela, J.B., Cruz, A.G. and Sant'Ana, A.S.. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: a review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Sciences & Technology*, Vol. 57, 11 - 19.

Olvera-García, M., Serrano-Maldonado, C. y Quirasco, M.. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología*, Vol. 19, No. 1, 25 - 43.

Ortez, J.H.. (2005). Disk diffusion testing. In: Coyle, M.B. (Ed.), *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. Chapter 3, 39 - 42. American Society for Microbiology.

Ortolani, M.B.T., Moraes, P.M., Perin, L.M., Viçosa, G.N., Carvalho, K.G., Silva Júnior, A. and Nero, L.A.. (2010). Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 93, No. 7, 2880 - 2886.

O'Sullivan, D.J., Giblin, L., McSweeney, P.H.L., Sheehan, J.J. and Cotter, P.D.. (2013). Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Frontiers in Microbiology, Food Microbiology*, Vol. 4, 1.

Ouzari, H., Najjari, A., Amairi, H., Gtari, M., Hassen, A. and Boudabous, A.. (2008). Comparative analysis of *Lactococcus lactis* bacteriocins and preliminary characterisation of a new proteinase K resistant lactococcin member. *Annals of Microbiology*, Vol. 58, No. 1, 83 - 88.

Padilla, L.B.. (2014). Yeast diversity in artisanal cheeses: biotechnological applications. Doctoral thesis. Universitat Politècnica de València. Valencia, España.

Pagthinathan, M. and Nafees, M.S.M.. (2015). Biochemistry of cheese ripening. *Agrieast*, Vol. 10, 16 - 26.

Pal, V., Pal, A., Patil, M., Ramana, K.V. and Jeevaratnam, K.. (2010). Isolation, biochemical properties and application of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* isolates. *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 34, No. 6, 1064 - 1079.

Palacios, V.S.. (2006). Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo. Tesis de Grado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, México.

Panda, S.K.. (2012). Screening methods in the study of antimicrobial properties of medicinal plants. *International Journal of Biotechnology and Research*, Vol. 2, No. 1, 1 - 35.

Pang, A., Liang, M., Prentice, M.B. and Pickersgill, R.W.. (2012). Substrate channels revealed in the trimeric *Lactobacillus reuteri* bacterial microcompartment shell protein PduB. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallographic*, Vol. 68, No. 12, 1642 - 1652.

Papagianni, M.. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4): e201210003.

Papagianni, M. and Papamichael, E.M.. (2014). Production of pediocin SM-1 by *Pediococcus pentosaceus* Mees 1934 in fed-batch fermentation: effects of sucrose concentration in a complex medium and process modeling. *Process Biochemistry*, Vol. 49, No. 12, 2044 - 2048.

Parra, H.R.A.. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, Vol. 8, No. 1, enero - junio, 93 - 105.

Peralta, G.H.. (2014). Bioformación de flavour en quesos vía metabolismo de aminoácidos por fermentos lácticos primarios y adjuntos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Pérez, M.X. y Montoya, C.D.. (2013). Formación de endoesporas en *Clostridium* y su interacción con el proceso de solventogénesis. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 15, No. 1, 180 - 188.

Perez, R.H., Perez, M.T.M. and Elegado, F.B.. (2015). Bacteriocins from lactic acid bacteria: a review of biosynthesis, mode of action, fermentative production, uses, and prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*, Vol. 08, No. 2, 61 - 67.

Persson, A.. (2015). Yeast in forage crops and silage aerobic stability at 15 Swedish dairy farms. Master thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.

Phillips, C.J.C.. (2009). Grazing management and systems. In: Phillips, C.J.C. (Ed.), *Principles of cattle production*. 2nd Edition. Chapter 9, 188 - 200. University of Queensland, Australia. Brisbane, Australia.

Piltz, J.W. and Kaiser, A.G.. (2004). Principles of silage preservation. In Kaiser, A.G., Piltz, J.W., Burns, H.M. and Griffiths, N.W. (Eds.), *Successful silage*, 2nd. Edition, Chapter 2, 25 - 56. Dairy Australia and NSW Department of Primary Industries.

Pinargote, Y.C.E.. (2009). Evaluación de los recuentos microbiológicos de la leche en predios con distintos sistemas de manejo. Identificación de puntos de control y sugerencia de acciones correctivas. Tesis Magistral. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Pingitore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F. and Nader-Macías, M.E.. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Vol. 2, 557 - 568.

Platero, A.M.M.. (2008). Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Granada, España.

Poehlein, A., Riegel, K., König, S.M., Leimbach, A., Daniel, R. and Dürre, P.. (2015). Genome sequence of *Clostridium sporogenes* DSM 795^T, an amino acid-degrading, nontoxic surrogate of neurotoxin-producing *Clostridium botulinum*. Standards in Genomic Sciences, Vol. 10, No. 40.

Proctor, V.A. and Cunnigham, F.E.. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 26, No. 4, 359 - 395.

Prudêncio, C.V., dos Santos, M.T. and Vanetti, M.C.D.. (2015). Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. Journal of Food Science & Technology, Vol. 52, No. 9, 5408 - 5417.

Qi, P.X.. (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. Le Lait, INRA Editions, Vol. 87, No. 4 - 5, 363 - 383.

Quigley, L., O'Sullivan, D.J., Daly, D., O'Sullivan, O., Burdikova, Z., Vana, R., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., McSweeney, P.L.H., Giblin, L., Sheehan, J.J. and Cotter, P.D.. (2016). *Thermus* and the pink discoloration defect in cheese. MSystems, 1(3): e00023-16.

Quigley, L., O'Sullivan, D.J., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D.. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 37, No. 5, 664 - 698.

Raats, D., Offek, M., Minz, D. and Halpern, M.. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. Food Microbiology, Vol. 28, No. 3, 465 - 471.

Rainey, F.A., Hollen, B.J. and Small, A.M.. (2009). *Clostridium*. In: Whitman, W.B. (Ed.), Bergey's Manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley & Sons Inc., in association with Bergey's Manual Trust.

Rajaram, G., Manivasagan, P., Gunasekaran, U., Ramesh, S., Ashokkumar, S., Thilagavathi, B. and Saravanakumar, A.. (2010). Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 4, No. 12, 895 - 902.

Ramírez, C.M.del C.. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Grado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Mexico.

Ramírez-López, C. y Vélez-Ruiz, J.F..(2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, Vol. 6, No. 2, 131 - 148.

Ramírez-Nolla, S. y Vélez-Ruiz, J.F.. (2012). Queso Oaxaca: panorama del proceso de elaboración, características fisicoquímicas y estudios recientes de un queso típico mexicano. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, Vol. 6, No. 1, 1 - 12.

Rascón, S.M.A.. (2016). Producción de bacteriocinas de bacterias lácticas aisladas de encurtidos. Tesis de Grado. Universidad de Jaén. Jaén, España.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P.. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, Vol. 1, No. 4, 218 - 228.

Reginensi, S.M., Olivera, J.A., Bermúdez, J. and González, M.J.. (2016). *Lactobacillus* in the dairy industry: from natural diversity to biopreservative resources. In: Castro-Sowinski (Ed.), *Microbial models: from environmental to industrial sustainability*, *Microorganisms for sustainability*, Vol. 1. Chapter 4, 57 - 81. Springer Science+Business Media Singapore.

Reindl, A., Dzieciol, M., Hein, I., Wagner, M. and Zangerl, P.. (2014). Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science*, Vol. 97, No. 10, 6036 - 6045.

Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. and Penna, A.L.B.. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, Vol. 4, No. 2, 124 -140.

Relloso, M.S., Nievas, J., Fares, T.S., Farquhason, V., Mujica, M.T., Romano, V., Zarate, M.S. y Smayevsky, J.. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 47, No. 2, 103 - 107.

Renye, J.J.A. and Somkuti, G.A.. (2015). Bacteriocins of food grade lactic acid bacteria in hurdle technology for milk and dairy products. In: Datta, N. and Tomasula, P.M. (Eds.), *Emerging dairy processing technologies: opportunities for the dairy industry*. 1st Edition. Chapter 10, 267 - 306. John Wiley & Sons Ltd..

Reviriego, H.C.. (2009). "*Lactococcus lactis*" productores de pediocina PA-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Ricciardi, A., Guidone, A., Ianniello, R. G., Cioffi, S., Aponte, M., Pavlidis, D., Tsakalidou, E., Zotta, T. and Parente, E.. (2015). A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. *International Dairy Journal*, Vol. 43, 42 - 50.

Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T. and Rodríguez, A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiagio cheese by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 85, No. 1 - 2, 23 - 33.

Roces, C., Rodríguez, A. and Martínez, B.. (2012). Cell wall active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. *Probiotic and Antimicrobial Proteins*, Vol. 4, 4, 259 - 272. Springer Science+Business Media, New York, United States.

Roller, S. and Board, R.G.. (2011). Naturally occurring antimicrobial systems. In: Russell, N.J. and Gould, G.W. (Eds.), *Food Preservatives*. 2nd Edition. Kluwer Academic/Plenum

Publishers, New York.

Rooke, J.A. and Hatfield, R.D.. (2003). Biochemistry of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E. and Harrison, J.H. (Eds.), Silage science and technology, Agronomy monograph, Vol. 42, 95 - 139.. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin, United States.

Rossi, F., Marzotto, M., Cremonese, S., Rizzotti, L. and Torriani, S.. (2013). Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. Food Microbiology, Vol. 35, No. 1, 27 - 33.

Rouse, S. and van Sinderen, D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. Journal of Food Protection, Vol. 71, No. 8, 1724 - 1733.

Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala, H. and Lindström, M.. (2012). *Clostridium tyrobutyricum* strains show wide variation in growth at different NaCl, pH, and temperature conditions. Journal of Food Protection, Vol. 75, No. 10, 1791 - 1795.

Saavedra, L. and Sesma, F.. (2011). Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria. In: Drider, D. and Rebuffat, S. (Eds.), Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Chapter 7, 99 - 113. Springer Science+Business Media, New York, United States.

Sadek, Z.I., Refaat, B.M., El-Shakour, E.H.A., Mehanna, N.S. and Hassan, M.S.. (2017). Biocontrol of processed cheese by incorporation of probiotic bacteria and its metabolites. International Journal of Dairy Science, Vol. 12, No. 2, 93 - 104.

Sadishkumar, V. and Jeevaratnam, K.. (2017). Purification and partial characterization of antilisterial bacteriocin produced by *Pentosaceus pentosaceus* KJBC11 from *Idli* batter fermented with *Piper betle* leaves. Journal of Food Biochemistry, 42(1):e12460.

Saito, M.M.. (2014). Defectos más comunes en los quesos. Chr. Hansen. www.tecnolacteoscarnicos.com/resumen/2014/p3.pdf.

Šaková, N., Sádeká, J., Lejková, J., Puškárová, A., Koreňová, J., Kolek, E., Valík, Valík, Ľ., Kuchta, T. and Pangallo, D. (2015). Characterization of May bryndza cheese from various regions in Slovakia based on microbiological, molecular and principal volatile odorants examination. Journal of Food and Nutrition Research, Vol. 54, No. 3, 239-251.

Samuel, S.S.. (2015). Isolation, screening and characterization of bacteriocin producing lactobacilli and their application as food preservative. Doctoral thesis. Allahabad Agricultural Institute. Allahabad, India.

Şanlıbaba, P. and Güçer, Y.. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. Agriculture & Food, Journal of International Scientific Publications, Vol. 3, 451 - 457.

Sant'Anna, V., Malheiros, da S.P. and Brandelli, A.. (2011). Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. Food Research International, Vol. 44, No. 1, 326 - 330.

Santarelli, M.. (2012). Composition and dynamics of microbiota in different dairy

ecosystems. Doctoral thesis. University of Parma. Parma, Italy.

Saraiva, F.M.A., Nes, I.F., Baracat-Pereira, M.C., de Queiroz, V.M., Mantovani, H.C. and de Moraes, C.A.. (2014). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6.9. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 6, No. 5, 79 - 87.

Sato, H., Torimura, M., Kitahara, M., Ohkuma, M., Hotta, Y. and Tamura, H.. (2012). Characterization of *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 35, No. 7, 447 - 454.

Saucier, L.. (1997). Bacteriocin production and regulation in *Carnobacterium piscicola* LV17. Doctoral thesis. University of Alberta. Edmonton, Canada.

Sbodio, O.A. y Revelli, G.R.. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el "monitoreo" *online* del proceso. *Avances en la Argentina. RIA*, Vol. 38, No. 3, 236 - 246.

Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B. and Britton, R.A.. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, Vol. 156, No. 6, 1589 - 1599.

Schöbitz, T.R., Uribe, M.C., Molina, C.L.H. y Espina, U.F.. (2005). Control del desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo Gouda empleando diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. *Agro Sur*, Vol. 33, No. 1, 48 - 57.

Schroeder, J.W.. (2013). Silage fermentation and preservation. NDSU Extension Service, AS1254.

Seguí, P.A.. (2009). La explotación de vacas de leche. Factores de producción y bases de la comunicación para la innovación. Ediciones de la Universidad de Lleida. INO Reproducciones S.A..

Şenel, E. and Gürsoy, A.. (2015). Microbiology of processed liquid milk. In: Özer, B.H. and Akdemir-Evrendilek, G. (Eds.), *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*. Chapter 5, 95 - 112. CRC Press. Taylor & Francis Group.

Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P.S. and Poznanski, E.. (2011). Extension of Tòsela cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, Vol. 28, No. 5, 883 - 890.

Settanni, L., Gaglio, R., Guarcello, R., Francesca, N., Carpino, S., Sannino, C. and Todaro, M.. (2013). Selected lactic acid bacteria as a hurdle to the microbial spoilage of cheese: applications on a traditional raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, Vol. 32, No. 2, 126 - 132.

Settanni, L. and Moschetti, G.. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, Vol. 27, No. 6, 691 - 697.

Sgarbi, E.. (2012). Non starter lactic acid bacteria during cheese ripening: survival, growth and production of molecules potentially involved in aroma formation. Doctoral thesis. Università Degli Studi Di Parma. Parma, Italy.

Sharma, V., Aseri, G.K., Sohal, J.S., Khare, N. and Kumar, V.. (2016). Exploration of bacteriocins as potential food preservatives. International Journal of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Vol. 3, No. 1, 55 - 82.

Shayesteh, F., Ahmad, A. and Usup, G.. (2014). Bacteriocin production by a marine strain of *Bacillus* sp. Sh10: isolation, screening and optimization of culture condition. Biotechnology, Vol. 13, No. 6, 273 - 281.

Sheehan, J.J. (2011). Avoidance of gas blowing. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (Eds.), Encyclopedia of dairy sciences. 2nd Edition. Vol. 1, 661 - 666. Academic Press, Elsevier, United Kingdom.

Sheehan, J.J.. (2013). Milk quality and cheese diversification. Irish Journal of Agricultural and Food Research, Vol. 52, 243 - 253.

Shembil, S.S.. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with antimicrobial activity. Bachelor thesis. BRAC University. Dhaka, Bangladesh.

Shin, M.S., Han, S.K., Ryu, J.S., Kim, K.S. and Lee, W.K.. (2008). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. Journal of Applied Microbiology, Vol. 105, No. 2, 331 - 339.

Sieber, R., Rehberger, B., Schallet, F. and Gallman, P.. (2006). Technological aspects of copper in milk products and health implications of copper. ALP Science, Vol. 493, 1 - 15.

Skeie, S.. (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. In: Griffiths, M. (Ed.), Improving the safety and quality of milk. Volume 2: Improving quality in milk products. Chapter 16, 433 - 453. Woodhead Publishing.

Smid, E.J., Erkus, O., Spus, M., Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Alexeeva, S. and Kleerebezem, M.. (2014). Functional implications of the microbial community structure of undefined mesophilic starter cultures. Microbial Cell Factories, Vol. 13, Suppl. 1: S2. <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/S1/S2>.

Smith, K. and Johnson, M.. (2015). Part I: what is a spore?. Dairy Pipeline, Vol. 27, No. 1, 4 - 5.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R.. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman, 573 pp.

Soggiu, A., Piras, C., Mortera, S.L., Alloggio, I., Urbani, A., Bonizzi, L. and Roncada, P.. (2016). Unravelling the effect of clostridia spores and lysozyme on microbiota dynamics in Grana Padana cheese: a metaproteomics approach. Journal of Proteomics, Vol. 147, 21 - 27.

Solvay Chemicals. (2015). Peróxido de hidrógeno. Seguridad y manejo. Hoja de datos técnicos. HH-2323sp. www.solvaychemicals.us

Spivak, M.. (2010). Analysis of mass spectrometry data for protein identification in complex biological mixtures. Doctoral thesis. New York University. New York, United States.

Spolaor, D. and Marangon, A.. (1997). Experimental pre-ripening of hard cheeses at low temperature to prevent abnormal fermentation: effects on ripening. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, Vol. 48, No. 1, 43 - 52.

Stadhouders, J. (1990). Prevention of butyric acid fermentation by the use of nitrate. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Vol. 251, 40 - 46.

Stadhouders, J. and van den Berg, G.. (2012). Use of lysozyme for the prevention of butyric acid fermentation in Gouda cheese. Limited effect of the enzyme. Milk the vital force: posters presented at the XXII International Dairy Congress, The Hague. D. Reidel Publishing Company.

Stevens, M.J.A., Vollenweider, S., Meile, L. and Lacroix, C.. (2011). 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microbial Cell Factories*, Vol. 10, No. 1, 61.

Storari, M., Kulli, S., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Berthoud, H. and Arias-Roth, E.. (2016). Genomic approach to studying nutritional requirements of *Clostridium tyrobutyricum* and other clostridia causing late blowing defects. *Food Microbiology*, Vol. 59, 213 - 223.

Su, Y.-C. and Ingham, S.C.. (2000). Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 54, No. 3, 147 - 154.

Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P. and Malacarne, M.. (2014). Characteristics of raw milk produced by free-stall or tie-stall cattle herds in the Parmigiano-Reggiano cheese production area. *Dairy Science & Technology*, Vol. 94, No. 6, 581 - 590.

Sure, K.P., Kotnis, P.V., Bhagwat, P.K., Ranveer, R.C., Dandge, P.B. and Sahoo, A.K.. (2016). Production and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus viridescence* (NICM 2167). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 59, e16150518.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K. and Matošić, S.. (2010). Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 48, No. 3, 296 - 307.

Szabolcs, E.. (2014). Evaluating the benefits and risks of organic raw milk cheese. Challenges in the production of organic cheeses made from raw milk. Master thesis. University of Hohenheim, Germany and Aarhus University, Denmark.

Szczepankowska, A.K., Górecki, R.K., Kołakowski, P. and Bardowski, J.K.. (2013). Lactic

acid bacteria resistance to bacteriophage and prevention techniques to lower phage contamination in dairy fermentation. In: Kongo, M.J. (Ed.), Lactic acid bacteria - R & D for food, health and livestock purposes, chapter 2, 23 - 74. InTech.

Takala, T.M. and Saris, P.E.J.. (2007). Nisin: past, present and future. In: Riley, M.A. and Gillor, O. (Eds.), Research and applications in bacteriocins, Chapter 10, 181 - 213. Cromwell Press, Trowbridge, Wiltshire, UK.

Talukdar, P.K., Olguín-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D. and Sarker, M.R.. (2014). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. Research in Microbiology, Vol. 166, No. 4, 225 - 235.

te Giffel, M.C. and Wells-Bennik, M.H.J.. (2010). Good hygienic practice in milk production and processing. In: Griffiths, M.W. (Ed.), Improving the safety and quality of milk. Part II: contaminants in milk, 179 - 193. Woodhead Publishing Ltd..

Thierry, A., Berthier, F., Gagnaire, V., Kerjean, J.R., Lopez, C. and Noël, Y.. (2010). Eye formation and Swiss-type cheeses. In: Law, B.A. and Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of cheesemaking. 2nd Edition. 360 - 383. Blackwell Publishing Ltd..

Todorov, S.D. and Franco, B.G.M.. (2010). *Lactobacillus plantarum*: characterization of species and application in food production. Food Reviews International, Vol. 26, No. 3, 205 - 229.

Todorov, S.D., LeBlanc, J.G. and Franco, B.G.M.. (2012). Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 28, No. 3, 973 - 984.

Tonarelli, G. y Simonetta, A.. (2013). Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. Revista FABICIB, Vol. 17, 137 - 177.

Touraille, C. and Bergère, J.L.. (1974). La germination de la spore de *Clostridium tyrobutyricum*. Biochimie, Vol. 56, 404 - 422.

Trontel, A., Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B. and Novak, S.. (2011). Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp.. Food Technology and Biotechnology, Vol. 49, No. 1, 75 - 82.

Tulini, F.L. and De Martinis, E.C.P.. (2010). Improved adsorption-desorption extraction applied to the partial characterization of the antilisterial bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* C2. Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 41, No. 2, 493 - 496.

Tůma, Š., Kučerová, K. and Plocková, M.. (2008). Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. Czech Journal of Food Science, Vol. 26, No. 5, 324 - 332.

Turchi, B., Pero, S., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A., Pedonese, F.,

Nuvoloni, R. and Cerri, D.. (2016). Occurrence of *Clostridium* spp. in ewe's milk: enumeration and identification of isolates. Dairy Science & Technology, Vol. 96, No. 5, 693 - 701.

Turgis, M., Vu, D.K., Jamshidian, M., Maherani, B. and Lacroix, M.. (2016). Synergistic antimicrobial effect of combined bacteriocins against food pathogens and spoilage bacteria. Microbiological Research International, Vol. 4, No. 1, 1 - 5.

Turková, K., Rittich, B. and Španová, A.. (2012). Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. Chemical Papers, Vol. 66, No. 9, 842 - 851.

Uğraş, S., Sezen, K., Kati, H. and Demirbağ, Z.. (2014). Purification and characterization of an antibacterial substance produced by pest-originated *Serratia marcescens* Mm3. Turkish Journal of Biology, Vol. 38, No. 2, 177 - 184.

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M. and Visconti, A.. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. FEMS Microbiology Letters, Vol. 233, No. 2, 289 - 295.

Valladares, V.S.R.. (2016). Determinación del impacto de la política de precios por calidad del litro de leche en los centros de acopio del norte del Cantón Cayambe periodo 2008 - 2014. Tesis de Maestría. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Sangolquí, Ecuador.

van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L.. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 84, No. 6, 1131 - 1137.

Vandamme, P., De Bruyne, K. and Pot, B.. (2014). Phylogenetics and systematics. In: Holzapfel, W.H. and Wood, B.J.B. (Eds.). Lactic acid bacteria. Biodiversity and taxonomy, 1st Ed., Chapter 3, 31 - 44. Wiley Blackwell.

Vásquez, M.S.M., Suárez, M.H. y Zapata, B.S.. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición, Vol. 36, No. 1, 64 - 71.

Villani, F., Pepe, O., Mauriello, G., Salzano, G., Moschetti, G. and Coppola, S.. (1995). Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. International Food Microbiology, Vol. 25, No. 2, 179 - 190.

Villar, B.A. y Fernández, R.-A.B.. (1995). La contaminación butírica de la leche. Causas y efectos sobre los quesos. Hojas Divulgadoras, Nro. 10 HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España.

Vining, L.C.. (1992). Roles of secondary metabolites from microbes. In: Chadwick, D.J. and Whelan, J. (Eds.), Secondary metabolites: their function and evolution. Ciba Foundation Symposium 171, 184 - 198. John Wiley and Sons Ltd.. Chichester, England.

Vissers, M.M.M., Driehuis, F., Te Giffel, M.C., De Jong, P. and Lankveld, J.M.G.. (2006). Improving farm management by modeling the contamination of farm tank with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, Vol. 89, No. 3, 850 - 858.

Vissers, M.M.M.. (2007). Modeling to control spores in raw milk. Doctoral thesis. Wageningen University. Wageningen, Netherlands.

Vissers, M.M.M., Driehuis, F., Te Giffel, M.C., De Jong, P. and Lankveld, J.M.G.. (2007). Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, Vol. 90, No. 7, 3278 - 3285.

Vissers, M.M.M. and Driehuis, F.. (2009). On-farm hygienic milk production. In: Tamime, A.Y. (Ed.), *Milk processing and quality management*. Chapter 1, 1 - 22. Blackwell Publishing Ltd..

Walstra, P., Noomen, A. and Geurts, T.J.. (1993). Dutch-type varieties. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Volume 2 Major cheese groups. 2nd Edition. Chapter 2, 39 - 82. Springer-Verlag, Boston, MA, United States.

Warnecke, T. and Gill, R.T.. (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, Vol. 4, 25.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, No. 2, 697-703.

Wijnker, J.J., Weerts, E.A.W.S., Breukink, E.J., Houbner, J.H. and Lipman, L.J.A.. (2011). Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casing using nisin. *Food Microbiology*, Vol. 28, No. 5, 974 - 979.

Willey, J.M., Sherwood, L., Woolverton, C.J. and Prescott, L.M.. (2008). Prokaryotic cell structure and function. In: Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*. 7th Edition. Chapter 3, 39 - 78. McGraw-Hill Higher Education. New York, United States.

Woraprayote, W.. (2014). Antimicrobial peptide from lactic acid bacteria and development of antimicrobial film for food packaging. Doctoral thesis. Prince of Songkla University. Hat Yai, Thailand.

Xiao, Y.. (2014). *Clostridium perfringens* sporulation, germination and outgrowth in food: a functional genomics approach. Doctoral thesis. Wageningen University. Wageningen, Netherlands.

Xiao, Y., van Hijum, S.A.F.T., Abee, T. and Wells-Bennik, M.H.J.. (2015). Genome-wide transcriptional profiling of *Clostridium perfringens* SM101 during sporulation extends the core of putative sporulation genes and genes determining spore properties and germination characteristics. *PLoS ONE*, 10(5): e0127036.

Yarlagadda, A.B. (2014). Assessment of different novel approaches to accelerate cheese ripening for a range of applications. Doctoral thesis. University of Limerick. Limerick, Ireland.

Yerlikaya, O.. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. Food Science and Technology, Campinas, Vol. 34, No. 2, 221 - 229.

Yu, H.-S., Lee, N.-K., Jeon, H.-L., Eom, S.J., Yoo, M.-Y., Lim, S.-D. and Paik, H.-D.. (2016). Benzoic acid production with respect to starter culture and incubation temperature during yogurt fermentation using response surface methodology. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, Vol. 36, No. 3, 427 - 434.

Zalán, Z., Németh, E., Baráth, Á. and Hálasz, A.. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. Food Technology and Biotechnonology, Vol. 43, No. 3, 219 - 225.

Zamara, R.L.M.. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis de Doctorado. Universitat de Girona. Girona, España.

Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C. and De Vuyst, L.. (2000). Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. FEMS Microbiology Letters, Vol. 190, No. 2, 305 - 308.

Zhu, W.M., Liu, W. and Wu, D.Q.. (2000). Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. Journal of Applied Microbiology, Vol. 88, No. 5, 877 - 886.

Zhu, Y. and Yang, S.-T. (2004). Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. Journal of Biotechnology, Vol. 110, No. 2, 143 - 157.

Zucali, M., Bava, L., Colombini, S., Brasca, M., Decimo, M., Morandi, S., Tumburini, A. and Crovetto, G.M.. (2014). Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore-forming bacteria. Journal of the Science and Agriculture, Vol. 95, No. 6, 1294 - 1302.